

Untersuchungen über die Topographie der kleinen ribosomalen Untereinheit von Escherichia coli Wildtyp und Streptomycin Revertanten mit Hilfe von Ribonukleoprotein-Fragmenten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches
Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Rinke
aus Celle

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546603_0039

Untersuchungen über die Topographie
der kleinen ribosomalen Untereinheit
von *Escherichia coli* Wildtyp und
Streptomycin Revertanten mit Hilfe von
Ribonukleoprotein-Fragmenten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches
Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Rinke
aus Celle

1. Gutachter: Professor Dr. Wittmann
2. Gutachter: Professor Dr. Maurer
3. Gutachter: Professor Dr. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1976



Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	7
2.1. Herstellung von Ribosomen und ihren Untereinheiten	7
2.2. Gel-Elektrophorese	9
2.2.1. 1D-Gele zur Trennung von Ribonukleoprotein-Fragmenten	9
2.2.2. 1D-Elektrophorese mit SDS-Gelen	10
2.2.3. 1D-Gele zur Proteinanalyse	11
2.2.4. 2D-Gele zur Proteinanalyse	12
2.3. Herstellung und Identifizierung von RNP-Fragmenten aus 30S Untereinheiten von <u>Escherichia coli</u> Wildtyp und Streptomycin-Revertanten	
2.4. Analyse eines in Gegenwart von Natrium-desoxycholat hergestellten RNP-Fragments	14
2.5. Präparation von RNP-Fragmenten, die durch Formaldehyd vernetzt wurden	16
2.7. Identifizierung quervernetzter Proteine in Protein-RNA-Komplexen	17
2.8. RNA-Extraktion mit Phenol	18
2.9. Analyse von Wechselwirkungen zwischen entfernten Bereichen der 16S RNA (Tertiärwechselwirkung)	18
2.10. Oligonukleotid-Analyse	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Analyse von RNP-Fragmenten aus <u>Escherichia coli</u> A19 und den Streptomycin-Revertanten N422 und N433	20
3.1.1. Untersuchung der Mutanten nach der Methode von Morgan und Brimacombe	20
3.1.2. Entwicklung neuer Spaltungsbedingungen für die 30S Untereinheiten und <u>E.coli</u> Wildtyp und den Mutanten	22
3.2. Untersuchung eines kleinen RNP-Fragments mit den Proteinen S7 und S19	23

	<u>Seite</u>
3.2.1. Isolierung des RNP-Fragments in Gegenwart von Natriumdesoxycholat	23
3.2.2. Untersuchung des Protein-Gehaltes	25
3.2.3. Identifizierung des RNA-Gehaltes mit Hilfe der Oligonukleotid-Analyse	27
3.3. Untersuchung der Tertiärwechselwirkungen innerhalb der RNA des RNP-Fragments III	30
3.4. Analyse des RNA-Bindungsbereiches des Proteins S7, das durch UV-Licht vernetzt wurde	33
3.4.1. Identifizierung von Protein S7 in einem RNA-Komplex	33
3.4.2. Untersuchung der Bindungsstelle von Protein S7 innerhalb der RNA-Fragmente des RNP-Fragments III	38
3.5. Untersuchung Formaldehyd-induzierter Vernetzungsstellen von 30S Proteinen an der 16S RNA	40
3.5.1. Identifizierung von Protein-RNA-Vernetzung in "SDS-Fragmenten"	40
3.5.2. Identifizierung der Proteinvernetzungsstellen in "Harnstoff-Fragmenten"	45
3.6. Oligonukleotid-Analyse der RNA im RNP-Fragment II	52
4. Diskussion	62
4.1. Die Grenzen der "konventionellen Fragment-technik" und die Möglichkeiten zur Analyse der Protein-RNA-Vernetzung	62
4.2. Eingrenzung des Bindungsbereiches von Protein S7 innerhalb der 30S Untereinheit	64
4.5. Vergleich der Vernetzung mit Formaldehyd mit anderen Daten über die ribosomale Struktur	65
4.4. Untersuchungen der Tertiärwechselwirkungen innerhalb der 16S RNA	69
5. Zusammenfassung	71
6. Verzeichnis der Abkürzungen	73
7. Literaturverzeichnis	74
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

In der Erforschung der Ribosomen sind in den letzten zehn Jahren sehr große Fortschritte erzielt worden, und das Bakterienribosom gehört zu den bestuntersuchten Makromolekülkomplexen im Bereich der molekularen Biologie.

Die besondere Bedeutung der Ribosomen besteht zum einen darin, daß sie in jeder lebenden Zelle die Funktion der Proteinbiosynthese übernehmen. Andererseits eröffnet die Untersuchung der Ribosomenstruktur und ihrer Funktion die Möglichkeit, grundsätzliche Erkenntnisse über Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung zu gewinnen, die auch bei zahlreichen anderen Systemen in der Natur, z.B. Viren, Chromosomen, Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen, von großer Bedeutung sind.

Die Ribosomen lassen sich in zwei Gruppen untergliedern, die aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten (S) klassifiziert werden:

1. 70S Ribosomen der Prokaryonten, die bei niedriger Magnesiumkonzentration (<1 mM) in eine 50S und eine 30S Untereinheit zerfallen.
2. 80S Ribosomen der Eukaryonten, deren Untereinheiten mit 60S und 40S sedimentieren.

Die Funktion der Ribosomen ist grundsätzlich in allen Organismen gleich. Die genetische Information der Zelle, die in der DNA lokalisiert ist, wird in die messenger-RNA (m-RNA) oder Boten-RNA umgeschrieben (Transkription). Die Information der Boten-RNA wird mit Hilfe der Ribosomen in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt (Translation). Dabei kodieren jeweils drei Nukleotide (Tripletts) für eine Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz. Da das Codon nicht in direkte Wechselwirkung mit der Aminosäure treten kann, ist eine Transfer-RNA notwendig, die am einen Ende ein Anticodon hat, das zum Codon der m-RNA komplementär ist und am anderen Ende die Aminosäure trägt.

Diese Funktion bedingt eine komplexe Zusammensetzung des Ribosoms aus einer großen Anzahl von Einzelkomponenten. Der meist

untersuchte Organismus ist das gram-negative Bakterium Escherichia coli. Die kleine ribosomale 30S Untereinheit dieses Organismus ($MG\ 0,9 \times 10^6$) besteht aus der 16S RNA (1600 Nukleotide) und 21 verschiedenen Proteinen (S1 - S21), die große 50S-Untereinheit ($MG\ 1,55 \times 10^6$) aus der 23S RNA (3200 Nukleotide), der 5S RNA (120 Nukleotide) und 34 Proteinen (L1 - L34). Alle 54 Proteine sind isoliert worden. (Übersichtsartikel von Wittmann in 'Ribosomes', 1974). Die Molekulargewichte liegen zwischen 6.000 und 32.000, eine Ausnahme bildet S1 mit 65.000. Die ribosomalen Proteine sind vorwiegend basisch; d.h. ungefähr 70 Prozent haben einen isoelektrischen Punkt von pH 10 und mehr. Die Aminosäurezusammensetzung ist bekannt, und von etwa dreißig Proteinen ist inzwischen auch die Primärsequenz ermittelt worden (Übersichtsartikel von Wittmann und Wittmann-Liebold in 'Ribosomes', 1974).

Auch die Basensequenzen der Ribonukleinsäuren sind weitgehend untersucht. Die Primärsequenz der 5S RNA ist bekannt (Übersichtsartikel von Monier in 'Ribosomes', 1974). Die 16S RNA-Sequenz ist zu ungefähr 90 Prozent aufgeklärt und von der 23S RNA konnten bis heute zahlreiche Fragmente bestimmt werden (Übersichtsartikel von Fellner in 'Ribosomes', 1974).

Neben der Untersuchung der Einzelkomponenten ist es zum Verständnis der ribosomalen Funktionen wichtig, ihre räumliche Anordnung innerhalb des Partikels aufzuklären. Die bisherigen Daten über die ribosomale Topographie beziehen sich überwiegend auf die kleine Untereinheit und wurden durch verschiedene Methoden gewonnen.

Erste Informationen brachte die in vitro Rekonstitution der 30S Untereinheit aus ihren Einzelbestandteilen, die zu funktionell voll aktiven Partikeln führte (Traub und Nomura, 1968). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die ribosomalen Proteine eine unterschiedliche Affinität zur 16S RNA aufweisen. Nur sechs Proteine (S4, S7, S8, S15, S17 und S20) können einzeln und spezifisch an die 16S RNA binden (Übersichtsartikel von Zimmermann in 'Ribosomes', 1974).

Die Reihenfolge, in der sich die übrigen Proteine an die RNA anlagern, wurde durch die stufenweise Bildung der 30S Partikel

mit Hilfe der Rekonstitutionsmethode erforscht. Die Ergebnisse sind in der sogenannten 'Assembly map' zusammengefaßt (Held et al., 1974).

Eine andere Möglichkeit, etwas über den Aufbau des Ribosoms zu erfahren, besteht darin, zwei benachbarte Proteine mit bifunktionellen Reagenzien zu vernetzen. Die Identifizierung der isolierten Proteinpaaire erfolgt dann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (z.B. Lutter et al., 1972) oder bei der Anwendung von spaltbaren Vernetzungsreagenzien (z.B. Methyl-4-mercaptobutyrimidate) aufgrund ihrer Wanderung in der Gelelektrophorese (Sommer und Traut, 1975).

Die Zugänglichkeit der Proteine auf der Oberfläche der Untereinheiten kann durch chemische Modifikation, z.B. durch enzymatische Jodierung, geprüft werden (Michalski und Sells, 1975). Die Größe des Enzyms Lactoperoxidase verhindert ein Eindringen ins Innere der Partikel und bewirkt damit, daß nur die äußeren Bereiche der Proteine markiert werden. Durch die Kombination von Immunologie und Elektronenmikroskopie lassen sich ebenfalls Proteine auf der Oberfläche der ribosomalen Untereinheiten identifizieren. Dazu werden spezifische Antikörper für die ribosomalen Proteine hergestellt und die Bindungsstellen dieser Antikörper anschließend mit dem Elektronenmikroskop auf der Ribosomenoberfläche lokalisiert (Lake, 1976, Tischendorf et al., 1975).

Informationen über die Anordnung von RNA und Proteinen innerhalb der Untereinheiten ergaben sich durch die Untersuchung von Ribonukleoprotein-Fragmenten. Die Analyse dieser Fragmente zeigt, welche Gruppen von Proteinen an bestimmten Bereichen der RNA lokalisiert sind. Die Herstellung der RNP-Fragmente kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden: Morgan und Brimacombe (1973) unterwarfen intakte 30S Partikel einer milden Nuklease-Behandlung. RNA-Regionen, die nicht durch Proteine geschützt sind, werden gespalten und die Fragmente in der Gel-Elektrophorese oder der Zucker-Gradient-Zentrifugation getrennt.

Eine andere Methode besteht darin, einzelne Proteine an isolierte RNA bzw. RNA-Fragmente unter Rekonstitutionsbedingungen zu

binden (Übersichtsartikel Zimmermann et al., 1975). Nach dem enzymatischen Abbau der RNA ist es möglich, die Bereiche der RNA zu identifizieren, die durch das Protein geschützt sind. Diese Methode ist jedoch auf die schon erwähnten Bindungsproteine beschränkt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und Untersuchung von Ribonukleoprotein-Fragmenten, um weitere Informationen über die Protein-RNA-Wechselwirkung in intakten 30S Partikeln zu erlangen.

Die bisher aus intakten 30S Partikeln isolierten RNP-Fragmente können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine enthält die Proteine S7, S9, S10, S13, S14 und S19, bzw. kleine Gruppen dieser Proteine. Die andere Gruppe umfaßt die Proteine S4, S5, S8, S15, S16, S18 und S20 (Morgan und Brimacombe, 1973).

Die RNA-Sequenz, die der ersten Gruppe von Proteinen zugeordnet werden kann, umfaßt den 3'-Bereich der 16S RNA, d.h. 430 Nukleotide von Sektion o' - A (Yuki und Brimacombe, 1975). Die Bindungsstellen von Proteinen der zweiten Gruppe, S4, S8, S15 und S20, wurden mit Hilfe von isolierten Protein-RNA-Komplexen innerhalb einer 900 Nukleotide umfassenden Sequenz vom 5'-Ende der 16S RNA lokalisiert (Garrett et al., 1971, Zimmermann et al., 1972).

Protein S4 ist das einzige Protein dieser Gruppe, das auch noch spezifische Bindung an ein RNA-Stück mit etwa 500 Nukleotiden zeigt (z.B. Zimmermann et al., 1972). Die genaue Analyse der S4 Bindungsstelle ergab, daß zwei Kontaktbereiche mit der RNA (je 160 Nukleotide) vorhanden sind, die durch eine Region von ungefähr 120 Nukleotiden getrennt werden (Mackie und Zimmermann, 1975, Ungewickell et al., 1975).

Da das Protein S4 einen großen Bereich der RNA vor Nuklease-Verdauung schützt, wurde im ersten Teil der Arbeit versucht, aus 30S Untereinheiten mit mutiertem S4 weitere unterschiedliche RNP-Fragmente zu isolieren.

Veränderungen in den ribosomalen Proteinen S4 und S5 entstehen in Escherichia coli bei der Mutation von Streptomycin-Ab-

hängigkeit zu -Unabhängigkeit (Deusser et al., 1970, Birge und Kurland, 1970). Diese Mutation führt bei einigen dieser sogenannten Streptomycin-Revertanten zu einer reduzierten Bindungsaffinität von S4 an die 16S RNA (Daya-Grosjean et al., 1972). Die angewandten Spaltungsbedingungen ergaben trotz der relativ starken Veränderung im Protein keine Unterschiede zwischen den RNP-Fragmenten, die aus den S4-Mutanten und dem Wildtyp isoliert wurden.

Bei den Versuchen, kleinere RNP-Fragmente aus 30S Untereinheiten von Streptomycin-Revertanten und *Escherichia coli* Wildtyp zu isolieren, zeigten sich die Grenzen dieser Methode. Bedingungen, die durch Auffaltung des Partikels eine stärkere Spaltung der RNA erlauben, bewirken gleichzeitig, daß die Spezifität der RNA-Protein-Wechselwirkung verloren geht (Newton et al., 1975).

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten war es möglich, in Gegenwart des milden Detergenzes Natriumdesoxycholat ein kleines, spezifisches RNP-Fragment mit den Proteinen S7 und S19 sowie geringe Mengen von S13 oder S14 zu isolieren. Der RNA-Gehalt dieses RNP-Fragments besteht aus einer diskontinuierlichen Nukleotidsequenz. Es konnte nachgewiesen werden, daß zwischen den aus verschiedenen Bereich der 16S RNA stammenden RNA-Fragmenten auch in Abwesenheit der Proteine eine Wechselwirkung besteht. Um weitere Fortschritte in der Isolierung spezifischer RNP-Fragmente zu machen, wurde es aus den oben genannten Gründen notwendig, zuerst durch Quervernetzung eine kovalente Bindung zwischen der RNA und den Proteinen zu schaffen.

Quervernetzte Protein-RNA-Komplexe können beispielsweise durch Bestrahlung mit UV-Licht hergestellt werden.

Diese Methode führte zur Bildung stabiler Komplexe aus DNA und DNA-Polymerase (Markovitz, 1972) sowie aus t-RNA und der entsprechenden Aminoacyl-t-RNA-Synthetase (Schoemaker und Schimmel, 1974).

Die UV-Vernetzung ribosomaler Untereinheiten wurde zuerst von Gorelic (1975) angewandt. Dabei wurde eine RNA-Protein-Ver-

netzung dadurch bewiesen, daß bei steigenden Dosen UV-Lichts immer weniger Proteine extrahiert werden konnten. Um eine positive Identifikation der gebundenen Proteine zu ermöglichen, wurden in unserer Arbeitsgruppe Vernetzungsbedingungen entwickelt, die die Konformation der Untereinheiten nicht verändern und damit eine spezifische RNA-Protein-Wechselwirkung gewährleisten (Möller und Brimacombe, 1975). Die UV-Bestrahlung der ribosomalen Untereinheiten führte unter diesen Bedingungen zur spezifischen Vernetzung von Protein S7 in der 30S Untereinheit und von L4 im 50S Partikel.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Vernetzungsbereich des Protein S7 innerhalb der 16S RNA näher untersucht.

Da die UV-Bestrahlung ribosomaler Untereinheiten jeweils nur zur Vernetzung eines Proteins führte, wurden weitere Verfahren erforderlich, die die Vernetzung einer größeren Anzahl von Proteinen ermöglichen. Dies kann unter anderem durch die Anwendung von Formaldehyd erreicht werden.

Formaldehyd ist hauptsächlich als Reagenz zur 'Fixierung' von Ribosomen bekannt (Übersichtsartikel von Feldman, 1973), wodurch die Dissoziation in Proteine und r-RNA bei niedriger Magnesiumkonzentration verhindert wird. Amons und Möller (1972) stellten fest, daß die Fixierung weitgehend auf inter- oder intramolekularer Protein-Protein-Vernetzung beruht. Protein-RNA-Komplexe konnten von diesen Autoren nicht nachgewiesen werden.

Neuere Versuche mit sehr geringen Formaldehydkonzentrationen führten jedoch zur Vernetzung einer Anzahl von Proteinen mit der ribosomalen RNA (Möller et al., 1976). Obwohl keine stabile kovalente Bindung nachgewiesen werden konnte, wurden in dieser Arbeit aus den mit Formaldehyd behandelten 30S Untereinheiten spezifische RNP-Fragmente isoliert und die Vernetzungsstellen der Proteine innerhalb der 16S RNA lokalisiert.

2. Materialien und Methoden

2.1. Herstellung von Ribosomen und ihren Untereinheiten

Die Bakterienstämme Escherichia coli A19 und MRE 600 bzw. die Streptomycin-Revertanten N422 und N433 (Hasenbank et al., 1973) wurden in einem reichen Hefe-Pepton-Medium gezüchtet (7,5 g Difco Yeast-Extrakt; 7,5 g Difco Pepton-Extrakt; 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 g NaCl pro Liter).

Zur Herstellung doppelmarkierter radioaktiver Bakterien wurden Kulturen der genannten Stämme, die über Nacht in dem reichen Medium gewachsen waren, in ein Minimal-Medium gegeben (5 g Glucose; 7 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0,8 g Na_2SO_4 ; 0,1 g MgCl_2 ; 0,055 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,07 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g Methionin pro Liter) (Apirion, 1966). Nach Beginn der Wachstumsphase erfolgte die Isotopenzugabe, ^3H -Uridin (1 mCi/l) wird in die RNA eingebaut, ein ^{14}C -Aminosäure-Gemisch CFB 104 (0,25 - 0,5 mCi/l) in die Proteine. (Alle Isotopen wurden von der Firma Amersham bezogen). Die spezifische Radioaktivität der Ribosomen betrug nach der Präparation ca. 4×10^6 IpM/mg in der ^3H -RNA und ca. $0,5 \times 10^6$ IpM/mg in den ^{14}C -Proteinen.

Zur Markierung der RNA für die Nukleotid-Sequenzanalyse wurde Escherichia coli MRE 600 in einem Casamino-säure-Medium gezogen (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1 % NH_4Cl ; 3 % Glycerin; 30 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 mM CaCl_2 und 0,2 % Difco Casamino-säuren (Vitamin frei)) (Yuki, 1971) und mit ^{32}P -Orthophosphat (20 mCi/100 ml) markiert. Für die ^{32}P -RNA betrug die Aktivität ca. 1×10^8 IpM/mg.

Nach dem Wachstum wurden sowohl die unmarkierten als auch die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierten Bakterien abzentrifugiert und mit 10 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, zweimal gewaschen. Das durch Zentrifugation erhaltene Sediment (10 Min bei $13.000 \times g$) wurde mit der 2,5 fachen Menge Aluminiumoxyd (Alcoa 205) zerrieben (Tissières et al., 1959) und dann im oben genannten Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit 10 μl DNase (1 mg/ml) durchmischt und zentrifugiert (10 Min bei $13.000 \times g$). Nach zweimaligem Waschen des Sediments mit 2 ml Puffer wurden die gesammelten Überstände 20 Min bei 20.000 UpM im Beckman Ti50 Rotor zentrifugiert, um nicht-ribosomale Zell-

reste abzutrennten. Dieser Überstand wurde anschließend 4 Std mit 40.000 UpM im gleichen Rotor zentrifugiert.

Das Sediment, das die 7oS Ribosomen enthält, wurde in 5 ml Puffer (s.o.) gelöst und einer Ammoniumchlorid-Waschung unterzogen, um Faktoren sowie unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (Salzkonzentration während der Waschung: 10 mM Magnesiumacetat; 0,5 M NH_4Cl ; 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 6 mM 2-Mercaptoäthanol). Die so gewaschenen 7oS Ribosomen wurden abzentrifugiert (4 Std bei 40.000 UpM im Beckman Ti50 Rotor) und durch Zuckergradienten-Zentrifugation (10 - 40 % Saccharose-Gradient mit 0,3 mM Magnesiumacetat; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 6 mM 2-Mercaptoäthanol) in 3oS und 5oS Untereinheiten aufgetrennt (17 Std bei 20.000 UpM im Beckman SW 25 Rotor). Nach dem Auspumpen des Gradienten wurde die Radioaktivität bzw. Absorption in jeder Fraktion bestimmt, und die entsprechenden Fraktionen von 3oS und 5oS wurden mit dem doppelten Volumen Äthanol bei -20°C gefällt. Die Untereinheiten wurden abzentrifugiert (10 Min bei 13.000 x g) und in einer Lösung von 0,3 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 6 mM 2-Mercaptoäthanol bei -80°C aufbewahrt.

Für die Herstellung großer Mengen unmarkierter Untereinheiten wurden ca. 40 - 60 g Escherichia coli-Zellen, die in reichen Hefe-Pepton Medium gezüchtet worden waren (siehe oben), mit der 2,5 fachen Menge Aluminiumoxyd zerrieben (Tissières et al., 1959). Die 7oS Ribosomen wurden entsprechend der oben beschriebenen Methode gewonnen. Die Auftrennung in die Untereinheiten erfolgte in einem 10 - 38 % Saccharose-Gradienten (0,3 mM Magnesiumacetat; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 6 mM 2-Mercaptoäthanol) mit Hilfe der Zonal-Zentrifugation in einem Beckman Ti XV Rotor (17 Std bei 25.000 UpM). Die Gewinnung und Aufbewahrung der Untereinheiten erfolgte wie oben beschrieben.

Die Aufarbeitung der ^{32}P -markierten Bakterien erfolgte nach der von Yuki und Brimacombe (1975) modifizierten Methode von Ron et al. (1966): Die Zellen wurden mit 1 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, gewaschen. Die Zerstörung der Zellen

erfolgte durch Lysozym (1 mg/ml) im obengenannten Puffer und anschließendes schnelles Einfrieren und Auftauen. Dann wurde eine Natriumdesoxycholat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,66 % zugegeben und noch mehrmals eingefroren und aufgetaut. Die Magnesium-Konzentration wurde bis 10 mM erhöht und eine 10 minütige Inkubation bei 0°C mit DNase durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

2.2 Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der RNP- und RNA-Fragmente, die Entfernung freier Proteine von quervernetzten Komplexen sowie die ein-dimensionale Analyse von Proteinen wurden mit Hilfe von Platten-gelen (22 cm x 15 cm x 0,25 cm) durchgeführt (Brimacombe et al., 1971). Das untere Ende des vertikalen Gelsystems wurde direkt in den Reservoir-Puffer gestellt, das andere Ende durch ein Schwammtuch mit der oberen Pufferkammer verbunden.

Die zwei-dimensionale Protein-Analyse erfolgte nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970).

2.2.1 1D-Gele zur Trennung von Ribonukleoprotein-Fragmenten

Die Trennung der RNP-Fragmente erfolgte auf 5 % Polyacrylamid/ 0,5 % Agarose-Gelen (Dahlberg et al., 1969). Die Gelbildung erfolgte durch 4,5 % Acrylamid, 0,5 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,5 % Agarose, 0,04 % Dimethylaminopropionitril und 0,03 % Ammoniumperoxodisulfat. Die Puffersysteme wurden variiert:

(a) "pH 8-Gel-System"

1 mM Magnesiumacetat; 20 mM KCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,8, im Gel; im Reservoir Puffer 25 mM Tris-Zitronensäure, pH 8,8, anstelle von Tris-HCl (Morgan und Brimacombe, 1972).

(b) "pH 6-Gel-System"

1 mM Magnesiumacetat; 25 mM Essigsäure; 20 mM Kaliumphosphat pH 6, im Gel; 1 mM Magnesiumacetat; 10 mM Kaliumacetat; 10 mM Kaliumphosphat, pH 6, im Reservoir-Puffer.

(c) "Ammonium-Gel-System"

5 mM Magnesiumacetat; 20 mM NH_4Cl ; 75 mM Tris-HCl pH 7,8 im Gel; im Reservoir-Puffer 75 mM Tris-Zitronensäure, pH 8,8, anstelle von Tris-HCl.

Die Breite der Schlitze für die Probeneingabe ist abhängig von der zu trennenden Probe. Die Probenladung erfolgte mit dem gleichen Volumen einer warmen Agarose-Lösung zusammen mit Bromphenolblau (0,75 % Agarose in Reservoir-Puffer). Bromphenolblau dient zur Markierung der Lauffront.

Durch einstündige Färbung mit 0,5 % Methylenblau; 0,25 M Essigsäure; 0,25 M Natriumacetat und anschließender Entfärbung in Wasser wurden die RNP-Fragmente sichtbar gemacht.

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Gele geschnitten, die Gelscheiben über Nacht in Szintillationsmittel gelöst (8 % Soluene; 0,4 % PPO in Toluol) und im Packard Szintillationszähler gezählt.

2.2.2 1D-Elektrophorese mit SDS-Gelelen

Die im folgenden beschriebenen Gele dienten zur Untersuchung von ribosomaler RNA sowie zur Abtrennung freier Proteine von quervernetzten Komplexen, da SDS Proteine von der RNA abwäscht. (Alle SDS-Gele wurden ohne Agarose hergestellt).

(a) 5 % SDS-Gel

5 % Polyacrylamid (siehe oben) mit 0,1 % SDS; 2 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, im Gel; im Reservoir-Puffer 50 mM Tris-Zitronensäure, pH 8,8, anstatt Tris-HCl.

(b) 7 % SDS-Harnstoff-Gel

7 % Polyacrylamid Gel (wie oben, aber nur 0,015 % APS) mit 0,1 % SDS; 2 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 7 M umkristallisiertem Harnstoff in Gel. Der Reservoir-Puffer unterschied sich von dem oben beschriebenen durch den Zusatz von 7 M Harnstoff.

(c) 5 - 15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoff-Schicht

Der Gel-Gradient wurde durch Mischung zweier Lösungen mit je 0,1 % SDS; 2 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 0,01 % DMAPN;

0,03 % APS und 5 % bzw. 15 % Acrylamid hergestellt. Die schwächere Lösung wurde zuerst auf den Boden des Plattengels geleitet und die 15 % Lösung linear hinzugemischt. Nach der Polymerisation des Gels wurde in die Schlitze eine weitere 0,5 - 1 cm dicke Gel-Schicht gegossen (3 % Polyacrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff, sonst wie oben). Der Reservoir-Puffer war der gleiche wie beim 5 % SDS-Gel.

Die Radioaktivitätsmessung in den Gel-Scheiben entsprach der in Absatz 2.2.1 beschriebenen.

2.2.3 1D-Gele zur Proteinanalyse

Die ein-dimensionale Trennung der ribosomalen Proteine erfolgte auf Sarkosyl-Gelen. Das Detergenz Sarkosyl ermöglichte es, Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts zu trennen (Morgan, 1971). Die Analyse unvernetzter Proteine erfolgte auf einem 17,5 % Polyacrylamid-Gel mit 0,5 % Sarkosyl (Morgan und Brimacombe, 1972).

Zur Analyse quervernetzter Proteine wurde ein 17 - 23 % Sarkosyl-Gradienten-Gel angewendet, das schärfere Banden ergibt (Möller und Brimacombe, 1975). Dazu wurden zwei Lösungen mit folgender Zusammensetzung gemischt: 17 % Acrylamid/1,45 % N,N'-Diallyl-Tartardiamid (für 17 %) bzw. 23 % Acrylamid/1,9 % N,N'-Diallyl-Tartardiamid (Anker, 1970) (für 23 %); 0,5 % Sarkosyl; 25 mM Tris-H₃PO₄, pH 8; 0,15 % TEMED; 0,02 % APS. Der Reservoir-Puffer enthielt 0,5 % Sarkosyl; 5 mM Tris-H₃PO₄, pH 8.

Die Elektrophoresen liefen bei 200 V (bzw. 300 V bei Gradienten-Gelen) und wurden beendet, wenn das zur Markierung dienende Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen war (ca. 24 Std). Nach zweistündiger Färbung (mit 1 % Amido-Schwarz; 12,5 % Essigsäure; 38 % Äthanol) und Entfärbung (mit 12,5 % Essigsäure; 38 % Äthanol) wurden die Proteinbanden sichtbar.

Radioaktive Proben wurden zusammen mit unmarkierten 30S-Gesamtproteinen auf das Gel aufgetragen. Nach Färbung und Entfärbung der Gele wurde die Radioaktivität in den gefärbten

Banden gemessen. Die Lösung der Gelscheiben erfolgte wegen des N,N'-Diallyl-Tartardiamids in 2 % Perjodsäure (Anker, 1970). Anschließend wurden die Proben in Triton-Szintillations-Mittel (33 % Triton-X 100; 66 % Toluol; 5 g/l PPO) gezählt (Stott et al., 1972).

2.2.4 2D-Gele zur Proteinanalyse

Die zwei-dimensionale Auftrennung der ribosomalen Proteine erfolgte nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970). Es wurden die kleineren Gele (Roth und Nierhaus, 1975) mit folgender Modifikation benutzt: anstatt Methylen-bisacrylamid wurde 2 % N,N'-Diallyl-Tartardiamid verwendet. Die Gele wurden 15 Min mit 0,5 % Amidoschwarz; 7 % Essigsäure gefärbt und mit 2 % Essigsäure entfärbt. Die Radioaktivitätsbestimmung in den gefärbten Flecken erfolgte wie bei Sarkosyl-Gele.

2.3 Herstellung und Identifizierung von RNP-Fragmenten aus 30S Untereinheiten von Escherichia coli Wildtyp und Streptomycin-Revertanten

Unmarkierte bzw. ^3H und ^{14}C markierte 30S Untereinheiten von E. coli A19 und den Streptomycin-Revertanten N422 und N433 (1 - 3 A_{260} Einheiten in 30 μl - 80 μl) wurden unter Standard-Bedingungen (d.h. in Gegenwart von 5 mM Magnesiumacetat; 20 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 und 2 M Harnstoff) mit RNase T_1 zwei Stunden bei Raumtemperatur gespalten (Enzymkonzentration: 17 Enzym Einheiten/ A_{260} Einheit Ribosomen). Außerdem wurden die Hydrolyse-Bedingungen variiert: Magnesiumacetat (0,3 - 5 mM); KCl (20 - 100 mM); RNase T_1 (2 - 30 Enzym Einheiten/ A_{260} Einheit Ribosomen). Die Hydrolysate wurden auf dem pH 8-Gel oder dem pH 6-Gel (2.2.1) bei 80 V elektrophoretisch getrennt, bis das zur Markierung dienende Bromphenolblau ungefähr 10 cm gelaufen war. Anschließend erfolgte die Anfärbung oder Radioaktivitätsmessung der Gele. Im letzteren Fall wurde ein 1,3 cm und ein

0,5 cm breiter Längsstreifen von jedem 2 cm Schlitz bis zum Bromphenolblau-Marker herausgeschnitten. Der 1,3 cm Streifen wurde für die Protein- bzw. RNA-Analyse aufgehoben und der 0,5 cm Streifen der Radioaktivitätsbestimmung unterworfen, nachdem beide gleichzeitig in 0,17 cm Scheiben geschnitten worden waren (Morgan und Brimacombe, 1972).

Zur Analyse der Proteine in den RNP-Fragmenten wurden bis zu 3 Gelscheiben des pH 6 bzw. pH 8 Systems in 1,3 cm breite Schlitzte eines 17,5 % Sarkosyl-Gel (2.2.3) geladen und mit einer Mischung aus 3 - 5 A_{260} Einheiten unmarkierten 30S Untereinheiten, 200 μ l 0,5 % Sarkosyl, 5 mM Tris- H_3PO_4 , pH 8; 5 μ l RNase A sowie mit Saccharose und Bromphenolblau überschichtet.

In anderen Versuchen wurden die Proteine extrahiert und mit Hilfe der 2D-Elektrophorese (2.2.4) identifiziert. Die Extraktion der Proteine erfolgte nach der Methode von Hardy et al. (1969) (vgl. Newton und Brimacombe, 1974). Die RNP-Fragmente enthaltenden Scheiben des pH 6- oder pH 8-Gels wurden zusammen mit 1 ml 0,1 M Magnesiumchlorid durch eine feine Nadel gepreßt. Anschließend wurden sofort 2 ml Eisessig sowie 15 A_{260} Einheiten unmarkierte 30S Untereinheiten zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 4°C gerührt, zentrifugiert (10 Min bei 13.000 x g) und der Überstand abpipettiert. Der Bodensatz wurde mit einer Mischung aus Essigsäure und 0,1 M Magnesiumchlorid (2:1) gewaschen. Die gesammelten Überstände wurden über Nacht gegen 2 % Essigsäure dialysiert. Anschließend wurde die Lösung in einem Rotationsverdampfer einrotiert, mit 2D-Probengel aufgenommen (Kaltschmidt und Wittmann, 1970) und der 2D-Elektrophorese unterworfen.

Die RNA der RNP-Fragmente wurde aus den entsprechenden Gelscheiben mit Phenol extrahiert (2.8) und auf einem 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2) analysiert.

2.4 Analyse eines in Gegenwart von Natriumdesoxycholat hergestellten RNP-Fragments

Mit ^3H und ^{14}C -Isotopen markierte 30S Untereinheiten (12 - 20 A_{260} Einheiten in 0,25 - 0,5 ml) bzw. ^{32}P -markierte 30S-Untereinheiten (4 - 7 A_{260} Einheiten in 0,15 - 0,25 ml) wurden in Gegenwart von 5 mM Magnesiumacetat, 20 mM KCl, 2 M Harnstoff, 0,2 % Natriumdesoxycholat und 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, mit RNase T_1 (67 Enzym Einheiten/ A_{260} Einheiten Ribosomen) gespalten. (Dauer der Hydrolyse: 2 Std bei Raumtemperatur). Das Hydrolyseprodukt wurde auf dem Ammonium-Gel-System (2.2.1) bei 90 V, 18 Std elektrophoretisch getrennt.

Nach der Radioaktivitätsbestimmung des Gels (vgl. 2.3) wurden die RNP-Fragmente wie beschrieben auf ihren Proteingehalt hin analysiert. Die Untersuchung des entsprechenden RNA-Gehaltes erfolgte nach Phenol-Extraktion (2.8) auf dem 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2) oder mit Hilfe der Oligonukleotid-Analyse (2.10).

2.5 Präparation von RNP-Fragmenten mit quervernetztem Protein S7

^3H und ^{14}C markierte 30S Untereinheiten von E. coli MRE 600 (ungefähr 30 A_{260} Einheiten insgesamt) wurden mit UV-Licht für 20 - 30 Min in einer Konzentration von 5 A_{260} Einheiten/ml bestrahlt. Die Bestrahlung wurde mit einer Sylvania G8T5 (USA) Germicidal UV-Lampe bei 5°C durchgeführt. Der Abstand von der Probe (ca. 1 mm Schichtdicke) betrug 4 cm. Der Puffer, mit dem die 30S Untereinheiten verdünnt wurden, enthielt 5 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 6 mM 2-Mercaptoäthanol (Möller und Brimacombe, 1975). Nach der Bestrahlung wurden die Untereinheiten mit 2 Volumen Äthanol gefällt und anschließend wieder in 0,3 mM Magnesiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 6 mM 2-Mercaptoäthanol gelöst, um eine Konzentration von ungefähr 30 A_{260} Einheiten/ml zu bekommen. Die Hydrolyse fand unter Standard-Bedingungen statt (vgl. 2.3). Unbestrahlte 30S Untereinheiten wurden als Kontrolle der gleichen Hydrolyse unterworfen.

Die Trennung des Hydrolysates erfolgte sowohl durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation als auch durch Gel-Elektrophorese. Im ersten Fall wurde die Probe auf einen 7,5 - 30 % Saccharose-Gradienten mit einer Pufferkonzentration von 5 mM Magnesiumacetat, 20 mM KCl, 25 mM Tris-Zitronensäure, pH 8,8, 6 mM 2-Mercaptoäthanol geladen. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW 25,1 Rotor bei 23.000 Upm für 18 Std. Die RNP-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und mit Äthanol gefällt. Zur Verbesserung der Fällung wurde eine kleine Menge unmarkierter 30S Untereinheiten zugefügt. Die Präzipitate wurden in 5 mM EDTA, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, gelöst und auf ein 5 % SDS-Gel (2.2.2) geladen, um ungebundene Proteine von den RNA-Fragmenten mit vernetztem S7 zu trennen (siehe Ergebnisse).

Zur Trennung des Hydrolyse-Produktes durch Gel-Elektrophorese, wurde die Probe in einen 5 cm breiten Schlitz eines pH 6-Gels (2.2.1 ohne Agarose) geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 18 Std bei 90 V. Anschließend wurde die Radioaktivität im Gel bestimmt (vgl. 2.4) und die RNP-Fragmente enthaltenden Scheiben wurden direkt auf ein 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2) geladen. Um einen guten Kontakt zwischen den geladenen Scheiben und dem Gel zu erreichen, wurden die Scheiben mit einer Mischung aus Agarose und Reservoir-Puffer überschichtet.

Die SDS-Gel-Elektrophoresen liefen bei 100 V und wurden beendet, wenn das Bromphenolblau 12 cm (beim 5 % SDS-Gel) bzw. 14 cm (beim 7 % SDS-Harnstoff-Gel) weit gelaufen war. Danach erfolgte Radioaktivitätsbestimmung der Gele. Die Identifizierung des quervernetzten Proteins S7 in den RNA-Fragmenten erfolgte nach der in Kapitel 2.7 beschriebenen Methode.

2.6 Präparation von RNP-Fragmenten, die durch Formaldehyd vernetzt wurden

Mit Äthanol gefällte ^3H und ^{14}C markierte 30S Untereinheiten von E. coli MRE 600 wurden in 5 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl und 25 mM Triäthanolamin-HCl, pH 7,8, gelöst (40 - 50 A_{260} Einheiten in 0,5 - 0,9 ml) und mit 0,03 % Formaldehyd 1 Std bei 37°C inkubiert (Möller et al., 1976). Nach Zugabe von Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 2 M wurden die Untereinheiten mit RNase T₁ (17 Enzym Einheiten/ A_{260} Einheit Ribosomen) 1 Std bei 25°C im Wasserbad hydrolysiert. Nicht mit Formaldehyd behandelte 30S Untereinheiten wurden der gleichen Behandlung unterzogen.

Das Hydrolysat wurde auf einen 5 - 7 cm breiten Schlitz eines pH 6-Gels (2.2.1, ohne Agarose) mit 0,03 % Formaldehyd in Gel und Reservoir-Puffer geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 240 V für 4 Std. Zur Entfernung nicht vernetzter Proteine und zur Trennung der RNA-Fragmente wurden die RNP-Fragmente enthaltenden Gelscheiben wie beschrieben auf ein 5 % SDS-Gel (2.2.2, aber mit Triäthanolamin-Puffer anstatt Tris-Puffer) oder auf ein 5 - 15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoff-Schicht (2.2.2 mit Triäthanolamin-Puffer) mit jeweils 0,03 % Formaldehyd in Gel und Reservoir-Puffer geladen. Der Triäthanolamin-Puffer war notwendig, da Formaldehyd mit der Aminogruppe im Tris-Puffer reagiert. Im Anschluß an die Elektrophorese (vgl. 2.5) und die Radioaktivitätsbestimmung des Gels wurden die vernetzten Proteine in den RNA-Fragmenten bestimmt (2.7).

Die Acrylamid-Lösung sowie die Triäthanolamin-Puffer wurden 1 Std mit Bentonite (2 g/l) und Aktivkohle (2 g/l) gerührt und anschließend filtriert, um einer möglichen Nuklease-Verunreinigung vorzubeugen.

2.7 Identifizierung quervernetzter Proteine in Protein-RNA-Komplexen

SDS-Gel-Scheiben, die einen vernetzten RNA-Protein-Komplex enthielten, wurden zusammen durch eine feine Spritze gepreßt. Das Homogenisat wurde über Nacht bei 5°C in einem Puffer (0,05 % SDS, 1 mM EDTA, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) zusammen mit 10 µl Ribonuklease A (1 mg/ml) gerührt. Anschließend wurde das Polyacrylamid abzentrifugiert und der Überstand auf 1 ml eingengt. Nach Zugabe von 3 - 5 A₂₆₀ Einheiten unmarkierter 30S Untereinheiten wurden die Proteine und die RNA-Fragmente durch Zugabe von vier Volumen Aceton und einem Volumen Äthanol für einige Stunden bei -20°C gefällt. Das Sediment wurde in 200 µl 0,5 % Sarkosyl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-H₃PO₄, pH 7,8, 6 mM 2-Mercaptoäthanol gelöst und mit weiteren 5 µl RNase A sowie 10 µl RNase T₁ (100.000 Einheiten/ml) 30 Min bei 37°C inkubiert. Der Überschuß an Enzym diente dazu, die RNA soweit wie möglich abzubauen. Die Proben wurden auf 17 - 23 % Sarkosyl-Gradient-Gelen getrennt (vgl. 2.2.3). Nach der Anfärbung der Gele wurde die Radioaktivität der gefärbten Banden bestimmt.

Proben für die 2D-Elektrophorese (2.2.4) wurden wie oben extrahiert. Der Überstand nach der Polyacrylamid-Abtrennung wurde bis auf 2 ml eingengt und zusammen mit 10 µl RNase A und 10 µl RNase T₁ (siehe oben) 30 Min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 15 A₂₆₀ Einheiten unmarkierter 30S Untereinheiten erfolgte die Fällung mit fünf Volumen Äthanol bei -20°C über Nacht. Das Präzipitat wurde in 200 µl 2D-Proben-gel gelöst (2.2.4) und elektrophoretisch getrennt. Nach der Färbung der Gele wurde die Radioaktivität der Proteinflecken bestimmt.

2.8 RNA-Extraktion mit Phenol

Zur Extraktion von RNA-Fragmenten aus RNP-Gelen (2.2.1) oder SDS-Gelen (2.2.2) wurden die entsprechenden Scheiben durch eine feine Spritze gepreßt. Das Homogenisat wurde mit 3 ml einer Mischung aus 50 % destilliertem Phenol und 50 % Puffer (1 % SDS; 100 mM Natriumacetat; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8) über Nacht bei 4°C gerührt. Nach der Zentrifugation (10 Min bei 11.000 x g) wurde die wäßrige Phase vorsichtig abpipettiert. Nach einmaligem Waschen der Phenolphase wurden die gesammelten Überstände nach Zugabe von 50 µg unmarkierter RNA (RNA aus Hefe; Boehringer) mit zwei Volumen Äthanol bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde entweder in SDS-Reservoir Puffer gelöst und auf SDS-Gelen weiteruntersucht, oder der Oligonukleotid-Analyse (2.10) unterworfen.

2.9 Analyse von Wechselwirkungen zwischen entfernten Bereichen der 16S RNA (Tertiärwechselwirkung)

³²P-markierte 30S Untereinheiten wurden unter Standardbedingungen hydrolysiert (siehe 2.3) und auf einem pH 6 - Gel (2.2.1) getrennt. Die RNP-Fragmente enthaltenden Scheiben wurden auf ein 5 % bzw. 7 % SDS-Gel ohne Harnstoff (2.2.2) geladen. Diese Gelsysteme trennen die Proteine von der RNA; sie zeigen jedoch nicht die versteckte Spaltung in der RNA (siehe Ergebnisse).

Nach der Elektrophorese und der darauffolgenden Radioaktivitätsbestimmung des Gels wurden die RNA-Fragmente in Gegenwart von Phenol (2.8) extrahiert und auf ein 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2) gebracht. Mit Hilfe des Harnstoffes (7 M) wurden die versteckten Spaltungen in der RNA sichtbar gemacht (Vigne und Jordan, 1971). Die Analyse der Radioaktivität erfolgte durch Schneiden und Zählen sowie durch Autoradiographie. Ein Teil der extrahierten RNA wurde zur Oligonukleotid-Analyse (2.10) verwendet.

2.10 Oligonukleotid-Analyse

Die mit Phenol extrahierten RNA-Fragmente wurden nach der Äthanol-fällung (2.8) in 10 μ l 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA gelöst und mit RNase T₁ (Sankyo, Enzym-RNA Verhältnis 1:20) 30 Min bei 37°C verdaut. Nach der Hydrolyse wurden die Proben lyophilisiert, in 1 - 2 μ l Wasser (doppelt-destilliert) gelöst und mit Hilfe zwei-dimensionaler "Fingerprints" untersucht (vgl. Sanger et al., 1965, Brownlee, 1972).

Die Trennung in der 1. Dimension erfolgte auf Zellulose-Acetat-Streifen (60 cm x 4 cm, Oxoid Ltd.) in einem 7 M Harnstoff-Essigsäure-Puffer, pH 3,5, bei 3 kV für 2 Std. Anschließend wurde die Probe auf DEAE-Zellulose-Papier (44 cm x 85 cm; Whatman DE-81) übertragen. Die Elektrophorese in der 2. Dimension wurde in 7 % Ameisensäure pH 1,7 bei 1,6 kV für 6 - 7 Std durchgeführt. Die Verteilung der Oligonukleotid-Flecken ("Fingerprints") wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die nähere Untersuchung der T₁-Produkte erfolgte durch Hydrolyse mit RNase A entsprechend der Methode von Uchida et al. (1974). Dazu wurden die Flecken aus dem DEAE-Papier ausgeschnitten, mit RNase A Lösung (1 mg/ml H₂O) durchgefeuchtet und bei 37°C 6 Std lang inkubiert. Die feuchten Papierstücke wurden auf ein zweites DEAE-Zellulose-Papier (vgl. oben) gepreßt. Die Trennung der RNase-A-Hydrolyse-Produkte erfolgte in einem Pyridinacetat-Puffer, pH 3,5, bei 1,6 kV für 12 Std.

Die Analyse der "Fingerprint"-Daten wurde folgendermaßen durchgeführt. Die gesamte Radioaktivität eines RNA-Fragments wurde durch seine Kettenlänge (Schätzung aufgrund der Wanderungsstrecke bei der Gel-Elektrophorese) dividiert und ergab die Radioaktivität pro Phosphat-Rest. Als nächstes wurde die Radioaktivität eines jeden Oligonukleotid-Flecks durch diese Radioaktivität/Phosphat dividiert und ergab die Zahl an Phosphat-Resten pro Fleck. Das letzte Ergebnis wurde durch die Anzahl an Nukleotiden pro Fleck (Schätzung aufgrund der Position im Fingerprint) dividiert und zeigte, in welchem molaren Verhältnis das Oligonukleotid im entsprechenden Fragment vorhanden war (Yuki und Brimacombe, 1975).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse von RNP-Fragmenten aus Escherichia coli A19 und den Streptomycin-Revertanten N422 und N433

3.1.1 Untersuchung der Mutanten nach der Methode von Morgan und Brimacombe (1972, 1973)

Die Mutanten N422 und N433 tragen eine Veränderung im Protein S4, d.h. bei der Mutante N422 ist das Protein 20 Aminosäuren länger, bei N433 20 Aminosäuren kürzer als das Protein S4 im Wildtyp (Hasenbank et al., 1973). Die mutierten S4-Proteine zeigen eine stärkere Basizität und haben eine geringere Bindungsaffinität zur 16S RNA (Daya-Grosjean et al., 1972).

Radioaktiv-markierte 30S Untereinheiten der Mutanten wurden zusammen mit Wildtyp-30S der Standard-Hydrolyse unterworfen (siehe 2.3 und vgl. Morgan und Brimacombe, 1972, 1973) und auf dem pH6-Gel (2.2.1) getrennt. Alle drei Stämme zeigten die gleiche Spaltung in drei Banden (I-III). Das Trennungsprofil der 30S Untereinheit vom E. coli Wildtyp ist in Abbildung 1 zu sehen. Die Laufposition der ersten Bande (I) entspricht der gesamten 30S Untereinheit.

Um festzustellen, ob die Mutation in S4 eine Änderung in der Proteinzusammensetzung der Mutanten-Fragmente gegenüber den Wildtyp-Fragmenten bewirkt hat, wurden die RNP-Fragmente II und III auf dem 17,5 % Sarkosyl-Gel analysiert oder die Proteinanalyse erfolgte auf dem 2D-Gelelektrophorese-System (2.2.4). Beide Fragmente zeigten sowohl bei den Mutanten als auch beim Wildtyp die gleiche Proteinzusammensetzung. Das RNP-Fragment III enthielt die Proteine S7, S9, S10, S14 und S19 und entsprach dem 430-Nukleotid-Fragment von Yuki und Brimacombe (1975). Im RNP-Fragment II war Protein S4 zusammen mit vier bis fünf anderen Proteinen vorhanden (Morgan und Brimacombe, 1973).

Um die Möglichkeit einer weiteren Spaltung innerhalb des Bindungsbereiches des mutierten Proteins S4 zu untersuchen,

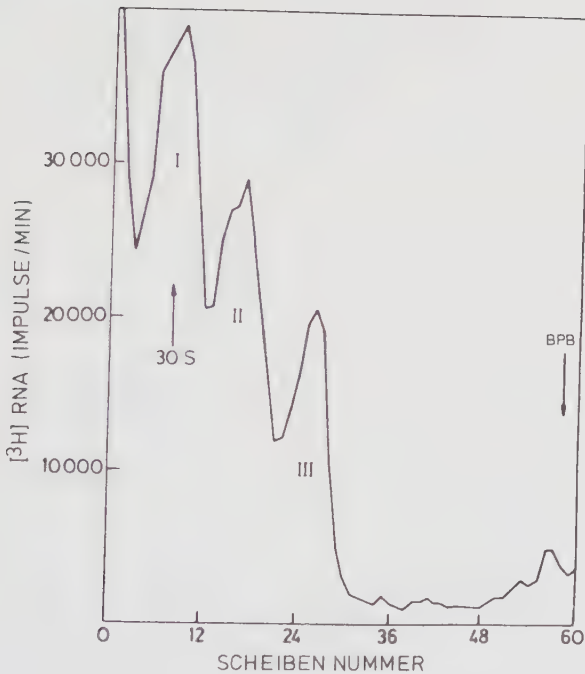


Abb. 1. Elektrophorese-Profil eines $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierten Hydrolysates von 30S Untereinheiten aus *E. coli* Wildtyp im pH6-Gel-System
Die Laufposition der nicht hydrolysierten 30S Kontrolle ist durch einen Pfeil markiert. Das Profil der ^{14}C -markierten Proteine entspricht dem der (^3H) RNA.
(Scheibenbreite 1,7 mm)

wurde durch Phenol extrahierte RNA (2.8.) des RNP-Fragments II aus den Mutanten und dem Wildtyp auf einem 7%-SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2.) getrennt. Das RNA-Fragment zeigte bei allen drei Stämmen ein ähnliches Spaltungsprofil (vgl. Abb. 10A und 11A).

3.1.2. Entwicklung neuer Spaltungsbedingungen für die 30S Untereinheiten von E. coli Wildtyp und den Mutanten

Da die Standard-Hydrolyse- und Trennungsbedingungen (2.3.) nicht ausreichten, neue kleinere RNP-Fragmente aus den 30S Untereinheiten der Mutanten zu isolieren, mußten andere Systeme für die Herstellung weiterer RNP-Fragmente entwickelt werden.

Die Ionenstärke sowie das Verhältnis von monovalenten (K^+) zu bivalenten Ionen (Mg^{++}) ist wichtig für eine funktionsfähige Konformation der Ribosomen und ihrer Untereinheiten. Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration bewirkt eine kompaktere Faltung der Partikel, während die Erhöhung der Kaliumkonzentration einen gegenläufigen Effekt hat (Spirin, 1974).

Aus diesem Grunde wurden die Salz- und Puffer-Konzentrationen sowohl im Hydrolyse-Puffer als auch im Gel-System variiert, um Bedingungen zu finden, die durch eine teilweise Auffaltung der Partikel die Isolierung kleinerer RNP-Fragmente ermöglichen. Die neuen Gelsysteme wurden mit hydrolysierten, unmarkierten 30S Untereinheiten von E.coli A19 und den Mutanten (siehe 2.3.) getestet. Aufgrund der Variationen des pH6- und des pH8-Gel-Systems sowie des Hydrolyse-Puffers (K^+ : 0-100 mM; Mg^{++} : 0.3 - 5 mM; Tris-Puffer: 25 - 75 mM bzw. Kalium-Puffer: 20 - 60 mM in allen Kombinationen) läßt sich zusammenfassend folgendes sagen. Neue RNP-Banden wurden nur unter Trennungsbedingungen beobachtet, die eine Auffaltung der Partikel bewirken (z.B. 1 mM Magnesium, 75 mM Tris-Zitronensäure-Puffer). Die Proteinanalyse dieser Banden zeigte jedoch, daß die Fragmente unspezifisch sind, da die meisten Proteine in nicht-äquimolaren Mengen in allen Fragmenten vorhanden waren.

Die Möglichkeit, daß eine Auffaltung der Untereinheiten eine unspezifische Bindung der Proteine bewirkt, wurde untersucht (Newton et al., 1975). Die Versuche wurden in Gegenwart von EDTA (5 mM) durchgeführt, einem Reagenz, das häufig zur Auffaltung von ribosomalen Untereinheiten benutzt wird (z.B. Gesteland, 1966). Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen z.B. 30S Proteine so frei beweglich sind, daß sie auch an die 23S RNA binden bzw. mit 50S Proteinen ausgetauscht werden.

3.2. Untersuchung eines kleinen RNP-Fragmentes mit den Proteinen S7 und S19

3.2.1. Isolierung des Fragmentes in Gegenwart von Natrium-Desoxycholat

Wie schon erwähnt, haben Yuki und Brimacombe (1975) ein RNP-Fragment mit den Proteinen S7, S9, S10, S14 und S19 isoliert. Die RNA dieses Fragmentes umfaßt ungefähr 430 Nukleotide von Sektion O'-A (Ehresman et al., 1975). Weiterhin wurden kleinere Fragmente mit den Proteinen S7 und S19 sowie mit S7, S19 und einem dritten Protein (S10, S13 oder S14) gefunden (Morgan und Brimacombe, 1973). Die kleinen Fragmente traten im Hydrolyse-Profil jeweils als Schulter des oben erwähnten Fragmentes auf, d.h. sie liefen etwas schneller.

Durch Optimierung der Spaltungsbedingungen konnte ein solches "Schulterfragment" reproduzierbar und in einer guten Ausbeute gewonnen werden. Diese Verbesserung konnte vor allem durch den Zusatz des milden Detergenzes Natriumdesoxycholat zum Standard-Hydrolyse-System (2.3.) sowie durch eine höhere Enzym-Konzentration erreicht werden. Die Trennung des Hydrolysates in einem 5 % Ammonium-Gel-System (2.2.1.) ist in der Abbildung 2 zu sehen. Ähnlich dem Elektrophorese-Profil nach der Standard-Hydrolyse (2.3. und vgl. Abb. 1), ist eine Spaltung in drei große RNP-Bereiche (I-III) vorhanden. Das neue Fragment ist deutlich als Schulter auf der rechten Seite der Bande III zu sehen (Fraktion 31). Unter diesen Bedingungen

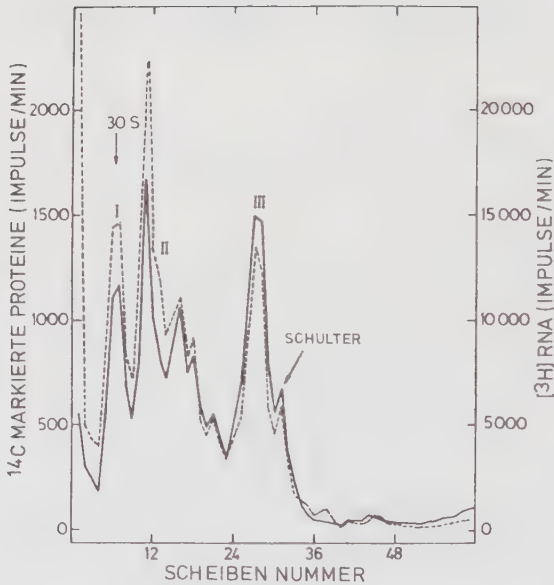


Abb. 2. Elektrophorese-Profil $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierter 30S Untereinheiten nach der Hydrolyse in Gegenwart von Natrium-desoxycholat auf einem 5 % Ammonium-Gel
Die BPB-Markierung lief bis Fraktion 78. Die Laufposition der unhydrolysierten 30S Kontrolle ist durch einen Pfeil markiert. (Scheibenbreite 1,7 mm)
(-----) ^{14}C -Radioaktivität in den Proteinen
(—) ^3H -Radioaktivität in der RNA

wird die 3oS Untereinheit (I) stärker abgebaut, und auch die Bande II zeigt weitere Spaltungen.

3.2.2. Untersuchung des Protein-Gehaltes

Zur Analyse der Proteine wurde jede Gelscheibe aus der Bande III und dem Schulter-Bereich (Abb. 2) zusammen mit unmarkierten 3oS Proteinen auf ein 17,5 % Sarkosyl-Gel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt und die Radioaktivität in den gefärbten Banden bestimmt. Die gemessene Radioaktivität pro Protein in jeder Gelscheibe wurde durch das entsprechende Molekulargewicht dividiert und ergibt so die ungefähre molare Protein-Zusammensetzung pro Gelfraktion (vgl. Morgan und Brimacombe, 1972, 1973).

Das Ergebnis der Proteinanalyse der Bande III und des Schulterfragments ist in Abb. 3 zu sehen.

Das Schulterfragment zeigt eine spezifische Protein-Zusammensetzung, d.h. nur die Proteine S7 und S19 sind deutlich und in äquimolaren Mengen vorhanden. Die Proteine S13 oder S14, die in diesem System nicht gut getrennt werden können, treten in submolaren Mengen auf. Die Protein-Zusammensetzung in der Bande III ist wenig spezifisch (Fraktion 25-28). Die bekannten, in der Bande III vorkommenden Proteine S7, S10, S14 (S13) und S19 sind nicht äquimolar. Außerdem sind mehrere andere Proteine vorhanden, die aus Spaltungsprodukten der Bande II stammen können. Die mangelnde Spezifität kann sowohl durch teilweisen Proteinaustausch (siehe 3.1.2. und Newton et al., 1975) als auch durch "Auswaschung" einiger Proteine, wie z.B. S9, aufgrund der Natriumdesoxycholat-Behandlung bewirkt worden sein.

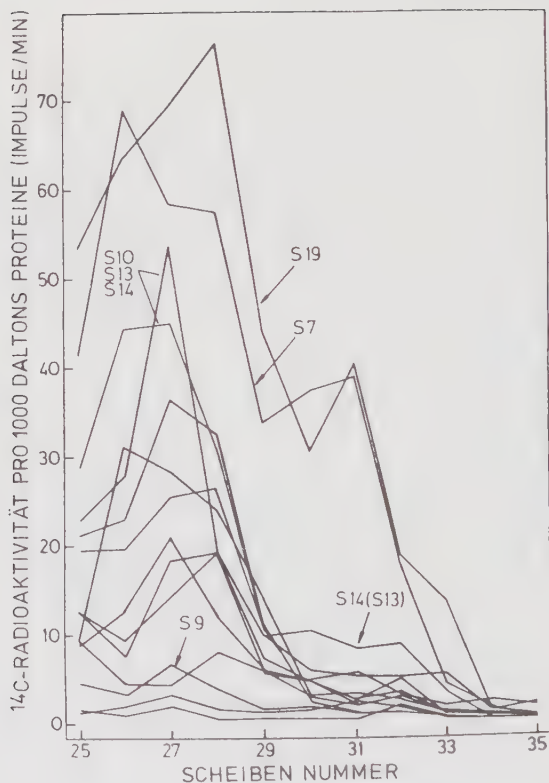


Abb. 3. Proteinanalyse des RNP-Fragmentes III und des Schulterfragmentes aus Abb. 2

Die Kurven zeigen die Radioaktivität jedes Proteins in jeder untersuchten Gelscheibe (Fraktion 25 - 35 in Abb. 2) dividiert durch das Molekulargewicht (3.2.2.).

3.2.3. Identifizierung des RNA-Gehaltes mit Hilfe der Oligonukleotid-Analyse

Zur Untersuchung des RNA-Gehaltes in der Bande III und in dem Schulterfragment wurden ^{32}P -markierte 30S Untereinheiten in Gegenwart von Natriumdesoxycholat hydrolysiert. Das Spaltungsprofil war identisch mit Abb. 2. Die RNA wurde aus beiden Fragmenten mit Phenol extrahiert (2.8.) und der Oligonukleotid-Analyse (2.10.) unterworfen. Die RNA der Bande III zeigte das gleiche Oligonukleotid-Muster wie die RNA aus der in Abwesenheit von Natriumdesoxycholat entstandenen Bande III (Yuki und Brimacombe, 1975). Im "Fingerprint" der RNA des Schulterfragments waren einige Oligonukleotid-Flecken hingegen nur sehr schwach vorhanden, oder sie fehlten ganz.

Abb. 3 zeigt ein Fingerprint der RNA des Schulterfragments. Die Positionen der Oligonukleotide, die im Vergleich zur RNA der Bande III fehlen, sind durch punktierte Kreise markiert. Die Nomenklatur der Oligonukleotid-Flecken entspricht der von Uchida et al. (1974) (vgl. auch Yuki und Brimacombe, 1975); d.h. die erste Zahl gibt jeweils den Uridin-Gehalt an und die zweite die Kettenlänge. Der kleine Buchstabe dient zur Unterscheidung zwischen Nukleotiden gleicher Zusammensetzung.

In Tabelle 1 sind die fehlenden Oligonukleotide und ihre Position innerhalb der 16S RNA aufgeführt.

Es zeigt sich, daß alle charakteristischen Oligonukleotide der Sektion K mit Ausnahme einer kleinen Menge von U-U-A-A-G (25e) fehlen. Das erste charakteristische Oligonukleotid der an Sektion K angrenzenden Sektion P A-U-A-A-A-C-U-G (28f) ist ebenfalls abwesend. Einige Oligonukleotide fehlen außerdem in Sektion E', die sich am 5'-Ende von Sektion K befindet. In diesem Bereich sowie in Sektion K erscheint in der 16S RNA viermal das Oligonukleotid U-U-G (23). Diese Sequenz ist im Fingerprint des Schulterfragments nur sehr schwach vorhanden. Ein zweites, aber sehr kleines Loch befindet sich am 3'-Ende der Sektion P, was sich durch die Abwesenheit der Oligonukleotid-Sequenz A-C-C-U-C-G (16c) zeigt. Dieses Oligonukleotid ist jedoch auch in der "DOC"-Bande III nur in ge-

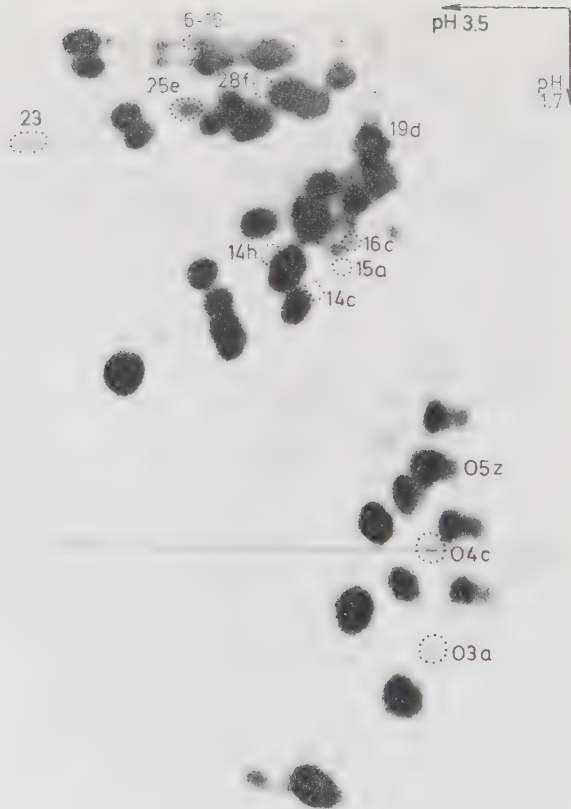


Abb. 4. Autoradiographie des "Fingerprints" von der isolierten RNA des Schulterfragments

Die 1. Dimension lief von rechts nach links, die zweite von oben nach unten. Die punktierten Kreise entsprechen den Oligonukleotiden, die im Gegensatz zur RNA des von Yuki und Brimacombe (1975) beschriebenen RNP-Fragments fehlen. Fleck 19d (Sektion K) wurde durch Sekundäranalyse mit RNase A von 19e (Sektion P) unterschieden. Die Flecken o5d (Sektion O'), o5g (Sektion D) und o5z (Sektion K) konnten nicht unterschieden werden. (siehe auch Tabelle 1)

Tabelle 1

Zusammenstellung der unterschiedlichen Oligonukleotide in den RNA-Sequenzen der untersuchten RNP-Fragmente

III. RNA des RNP-Fragments III von Yuki und Brimacombe (1976)

Doc-III: RNA des in Gegenwart von Natriumdesoxycholat isolierten RNP-Fragments III (Abb. 2)

Schulter: RNA des Schulterfragments (Abb. 2)

+: deutlich vorhandenes Oligonukleotid

(+): reduziert vorhandenes Oligonukleotid

-: abwesendes Oligonukleotid

(Die in Sektion K ebenfalls vorkommenden Oligonukleotide 14a und o5z wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. 14a ist auch in Sektion E vorhanden und o5z (CAACG) konnte nicht von Isomeren aus anderen Sektionen getrennt werden)

Fleck Nr.	Sequenz der Oligonukleotide	Sektion in der 16S RNA	Doc-III	Schulter
23	U-U-G *	E', K	+	-
15k	A-A-A-U-G	K	-	-
15a	U-C-C-C-G	K	+	-
25e	U-U-A-A-G	K	+	(+)
14c	C-C-U-G	K	+	-
6-16	C-A-A-C-C-U-U-A-U-C-C-U-U-U-G	K	+	-
o4c	C-C-A-G **	K	(+)	-
19d	A-A-C-U-C-A-A-A-G	K	+	-
14h	A-C-U-G	K	+	-
o3a	C-C-G	K	+	-
28f	A-U-A-A-A-C-U-G	P	+	-
16c	A-C-C-U-C-G	P	(+)	-
o4e	C-A-A-G	P'	+	(+)

* Dieses Oligonukleotid kommt zweimal im 3' Ende von Sektion E' und zweimal in Sektion K vor.

** Dieses Oligonukleotid kommt zweimal in Sektion K vor.

ringeren Mengen vorhanden. Oligonukleotide aus RNA-Bereichen außerhalb der Sektionen O'-A wurden nicht gefunden.

Der RNA-Gehalt des Schulterfragmentes unterschied sich damit von der RNA des RNP-Fragments III (Yuki und Brimacombe, 1975) vor allem durch das Fehlen der mittleren RNA-Region (Sektion K). Die Zusammenfassung der Daten befindet sich im RNA-Sequenz-Diagramm in Abb. 16.

Parallel zur Oligonukleotid-Analyse wurde ein Teil der mit Phenol extrahierten RNA des Schulterfragments auf einem 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2.) untersucht. Der Harnstoff in SDS-Gelen ermöglicht es, RNA-Fragmente zu trennen, die durch Sekundär- oder Tertiärwechselwirkung miteinander verknüpft sind; d.h. sogenannte versteckte Spaltungen werden sichtbar gemacht (Vigne und Jordan, 1971). Das Gelsystem diente dazu, die Größenverhältnisse der RNA-Fragmente abzuschätzen. Das Ergebnis (siehe nächstes Kapitel und Abb. 5) stimmte mit den Daten der Oligonukleotid-Analyse überein, und es waren, wie erwartet, drei Banden vorhanden.

3.3. Untersuchungen der Tertiärwechselwirkungen innerhalb der RNA des RNP-Fragments III

Die Analyse des RNA-Gehaltes des RNP-Fragments mit den Proteinen S7 und S19 ergab zwei Hauptnukleotid-Sequenzen der Sektionen O'-E' und P-A (siehe Kapitel 3.2.3. und Abb. 16). Es wurde untersucht, ob diese beiden RNA-Fragmente, die durch eine Sequenz von ungefähr 100 Nukleotiden getrennt sind (Sektion E'-K), allein durch Protein-RNA-Wechselwirkung oder auch durch RNA-RNA-Interaktion zusammengehalten werden. Im Falle von Tertiärwechselwirkung zwischen den RNA-Fragmenten müßte es möglich sein, von Protein freie RNA-Komplexe zu isolieren, bei denen Sektion K fehlt.

Aus diesem Grund wurden ³²P-markierte 30S Untereinheiten den bekannten Hydrolysebedingungen unterworfen (2.3.) und auf einem pH6-Gel getrennt (vgl. Abb. 1). Die Gelfractionen mit dem

RNP-Fragment III wurden direkt auf ein 5 % SDS-Gel (2.2.2.) geladen. SDS-Gele sind in der Lage, Proteine vollständig von RNA-Fragmenten abzutrennen (siehe nächstes Kapitel). Das Elektrophorese-Profil zeigt eine Spaltung in zwei Hauptbanden A und B, sowie eine Anzahl kleinerer Komponenten (vgl. Abb. 5A und Abb. 6). Die beiden Hauptbanden ähnelten in ihrem elektrophoretischen Verhalten dem RNP-Fragment III und dem Schulterfragment nach der "DOC-Hydrolyse" (siehe Abb. 2). Um eine bessere Trennung der kleineren RNA-Fragmente neben den Hauptbanden A und B zu erreichen, wurde das oben beschriebene Experiment mit einem 7 % SDS-Gel wiederholt und mit Phenol-extrahierter RNA von RNP-Fragment III verglichen. Die Gel-Autoradiographie dieses Versuches ist in Abb. 5A zu sehen.

SDS-Gele ohne Harnstoff zeigen normalerweise nicht die versteckten Spaltungen in der RNA. Die lange Phenolextraktion (über Nacht) führte jedoch auch in diesem System zu einer vollständigen Trennung der RNA von RNP-Fragment III in fünf Banden (Schlitz 1, Abb. 5A) (siehe Abb. 16 und vgl. Yuki und Brimacombe, 1975). Selbst die nicht mit Phenol extrahierte RNA von RNP-Fragment III (Schlitz 2, Abb. 5A) zeigt neben den Hauptbanden A und B schwache, aber deutliche Banden, die zu den RNA-Fragmenten 1-5 der extrahierten RNA korrespondieren. Die Bande 5 ist gegenüber den Banden 1-4 deutlich stärker, was darauf hinweist, daß dieses Fragment in Bande B fehlen könnte.

Im nächsten Schritt wurde die ^{32}P -markierte RNA der Banden A und B aus einem 5 % SDS-Gel extrahiert und sowohl durch Oligonukleotid-Analyse (2.10.) als auch auf einem 7 % SDS-Harnstoff-Gel untersucht. Die Fingerprint-Analyse der Bande B ergab, daß - entsprechend dem RNA-Gehalt des Schulterfragments (3.2.3.) - die wichtigsten Oligonukleotide der Sektion K fehlen. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch in der Autoradiographie des 7 % SDS-Harnstoff-Geles in Abb. 5B.

Die RNA der Bande A (Schlitz 4, Abb. 5B) ist in die erwarteten Subfragmente 1-5 getrennt (siehe Yuki und Brimacombe, 1975), während die RNA der Bande B (Schlitz 5, Abb. 5B) nur aus den Fragmenten 2, 3 und 4 besteht. Die Fragmente 1 und 5 konnten auch nach der Radioaktivitätsmessung des Geles im Szintillationszähler nicht entdeckt werden.

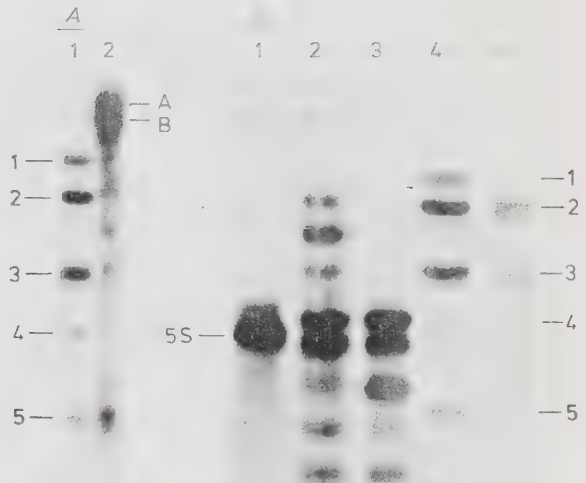


Abb. 5. Autoradiographie von RNA-Fragmenten nach SDS-Gel-Elektrophorese

A. Trennung auf einem 7 % SDS-Gel:

Schlitz 1: Phenol-extrahierte RNA von RNP-Fragment III

Schlitz 2: pH6-Gelscheiben mit RNP-Fragment III wurden direkt auf das Gel geladen

B. Trennung Phenol-extrahierter RNA auf einem 7 % SDS-Harnstoff-Gel:

Schlitz 1: 5S RNA

Schlitz 2: RNA aus dem Bereich der Bande III, die nach der "DOC-Hydrolyse" isoliert wurde (siehe Abb. 2)

Schlitz 3: RNA des Schulterfragments (Abb. 2)

Schlitz 4: RNA von Band A (Abb. 5A)

Schlitz 5: RNA von Band B (Abb. 5A)

(Die Numerierung der RNA-Banden erfolgte nach Yuki und Brimacombe, 1975)

Damit wurde gezeigt, daß Sektion K (Fragment 5) in Band B nicht vorhanden ist und daher eine Tertiärwechselwirkung zwischen den RNA-Sequenzen O'-E' und P-A stattfinden muß. RNA-Fragment 1 ist abwesend, da es aus den Fragmenten 2 und 5 besteht (siehe Abb. 16).

In Abb. 5B ist außerdem die RNA-Zusammensetzung von RNP-Fragment III und dem Schulterfragment aus der Hydrolyse in Gegenwart von Natriumdesoxycholat zu sehen (siehe 3.2.3.). Die im Vergleich zur 5S RNA (Schlitz 1, Abb. 5B) errechneten Kettenlängen für die drei RNA-Banden des Schulterfragments (Schlitz 3, Abb. 5B) von ungefähr 80, 110 und 120 Nukleotiden, stimmen mit den Ergebnissen der Oligonukleotid-Analyse überein (vgl. 3.2.3. und Abb. 16).

3.4. Analyse des RNA-Bindungsbereiches des Proteins S7, das durch UV-Licht vernetzt wurde

3.4.1. Identifizierung von Protein S7 in einem RNA-Komplex

Die Bestrahlung von 30S Untereinheiten mit UV-Licht führt zur kovalenten Bindung von Protein S7 an die 16S RNA (Möller und Brimacombe, 1975). In Vorversuchen zeigte sich, daß die beschriebenen Vernetzungsbedingungen bei einer Bestrahlungszeit von 30 Min die bekannte Spaltung der 30S Untereinheiten (vgl. 3.1.1.) nicht beeinflussen. Eine Reaktionskinetik für Protein S7 machte deutlich, daß die Menge an vernetztem S7 direkt von der Bestrahlungszeit abhängig ist. Bei einer 30-minütigen Bestrahlung sind 30 % des Proteins S7 vernetzt.

³H- und ¹⁴C-markierte 30S Untereinheiten wurden daher 20-30 Min mit UV-Licht bestrahlt (2.5.) und nach einer Äthanol-Fällung zusammen mit einer unbestrahlten 30S Kontrolle der Standard-Hydrolyse (2.3.) unterworfen. Die Hydrolysate wurden auf Saccharose-Gradienten und im pH6-Gel getrennt. Beide Systeme zeigten die gleiche Spaltung in die drei RNP-Fragmente I-III (vgl. Abb. 1). Die Spaltung der 30S Untereinheiten wurde durch die UV-Behandlung grundsätzlich nicht verändert.

Protein S7 wurde normalerweise als Bestandteil des RNP-Fragments III gefunden (Yuki und Brimacombe, 1975; Morgan und Brimacombe, 1973). Daraus kann jedoch nicht unmittelbar geschlossen werden, daß sich die UV-induzierte Bindungsstelle ebenfalls an der RNA des RNP-Fragments III befindet. Es besteht die Möglichkeit, daß S7 mehrere Kontaktpunkte mit der 16S RNA hat, die eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung haben.

Aus diesem Grund wurden die RNP-Fragmente II und III von Saccharose-Gradienten isoliert (siehe 2.5.) und auf ein 5 % SDS-Gel (2.2.2.) gebracht, um die ungebundenen Proteine von dem quervernetzten S7-RNA-Komplex zu trennen. Da dieses Gelsystem nicht die versteckten Spaltungen in der RNA zeigt, läuft die RNA der Bande II bzw. der Bande III weitgehend als ein großer Komplex. Die Elektrophorese-Profile der RNA der Banden II und III sind in Abb. 6 zu sehen. Die Kontrollversuche mit unbestrahlten Fragmenten zeigten ein identisches Bild, was darauf hinweist, daß quervernetztes Protein S7 keine Verschiebung des RNA-Gipfels bewirkt.

Das vernetzte S7 kann in diesem System nicht aufgrund des ^{14}C -Radioaktivitäts-Profils nachgewiesen werden, da bei der Markierung der Ribosomen mit ^3H - und ^{14}C -Isotopen ein geringer Teil des radioaktiven Kohlenstoffes auch in die RNA eingebaut wird. Die in die RNA eingebaute ^{14}C -Radioaktivität überdeckt die "S7-Radioaktivität".

Entsprechend den waagerechten Strichen in Abb. 6 wurden deshalb die Gelscheiben des 5 % SDS-Geles zusammengefaßt und der Proteinextraktion in Gegenwart von SDS und RNase A unterworfen (2.7.). Die Extrakte wurden zusammen mit unmarkierten 30S Untereinheiten noch einmal mit den Ribonukleasen T_1 und A inkubiert, um die RNA soweit wie möglich abzubauen, und auf ein 17 - 23 % Sarkosyl-Gradient-Gel (2.2.3.) gebracht. Abschließend wurden die Gele gefärbt und der Radioaktivitätsmessung unterworfen.

Die höchste Radioaktivität befand sich in den Proteingelen, die zur Analyse der Gelfractionen der Bande III (siehe Abb. 6)

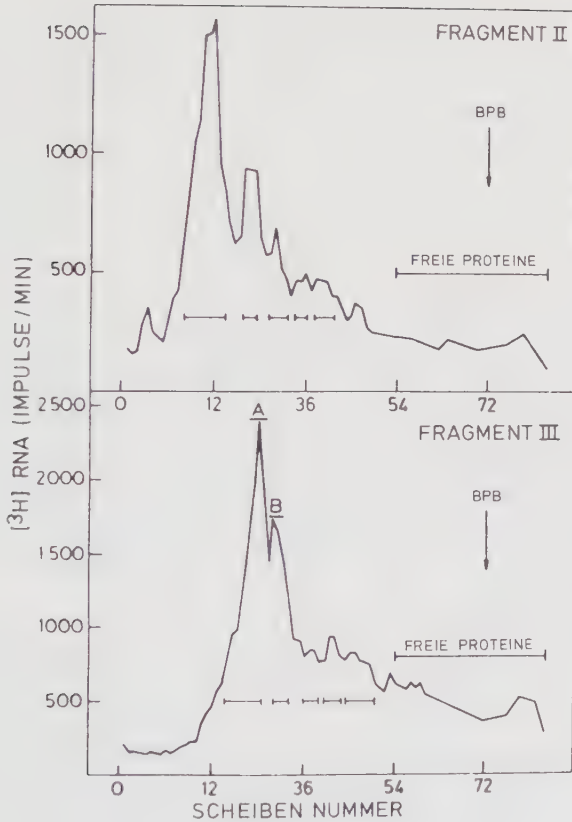


Abb. 6. Elektrophorese-Profil von RNA-Fragmenten in einem 5 % SDS-Gel

Das obere Bild zeigt die RNA von RNP-Fragment II, das untere die RNA von RNP-Fragment III, jeweils nach UV-Bestrahlung. Die freien ^{14}C -markierten Proteine laufen als breiter Komplex innerhalb der eingezeichneten Region. Die waagerechten Striche zeigen die Gelfraktionen, die auf vernetztem Protein S7 untersucht wurden. (Scheibenbreite 1,7 mm)

benutzt wurden, und zwar jeweils in der Position des quervernetzten Proteins S7. Trotz der starken Nuklease-Behandlung waren noch einige Nukleotide an das Protein gebunden, so daß quervernetztes S7 etwas langsamer lief als unvernetztes (vgl. Möller und Brimacombe, 1975). Abb. 7 zeigt als ein Beispiel die Proteinanalyse der RNA-Fraktion A aus dem RNP-Fragment III (Abb. 6). Neben den Hauptradioaktivitäten im quervernetzten S7 ist Radioaktivität in einigen anderen Proteinen in geringer Menge vorhanden.

Verglich man die gemessene Radioaktivität für quervernetztes Protein S7 in allen untersuchten RNA-Fraktionen, so zeigte sich, daß das S7 ausschließlich mit der RNA von Fragment III vernetzt ist. Alle Fraktionen der Bande II (Abb. 6) zeigten in einem typischen Versuch eine Radioaktivität von weniger als 50 IpM, während in Fraktion A (Bande III) 420 IpM, in Fraktion B (Bande III) 230 IpM und in den kleineren Fragmenten der Bande III ebenfalls deutliche Radioaktivität im S7-Bereich gemessen wurde.

Berücksichtigte man einen gewissen Verlust während der Analyse, so entsprach die Radioaktivitätsmenge für Protein S7 in Fraktion A und B (siehe Abb. 6) einem Vernetzungsgrad von 30 %, berechnet auf die gesamte RNA-Menge. Diese Tatsache war ein weiterer Hinweis dafür, daß die Hauptvernetzungsstelle für Protein S7 im Bereich der RNA von RNP-Fragment III liegt. Die Möglichkeit, daß quervernetztes Protein S7 mit freiem verwechselt wurde, bestand aufgrund der veränderten Beweglichkeit im Gel nicht (siehe Abb. 7 und Möller und Brimacombe, 1975). Außerdem hat das angewandte 5 % SDS-Gel die Eigenschaft, freie Proteine vollständig von der RNA zu trennen. Diese Feststellung wurde durch folgenden Versuch bewiesen: 30S Untereinheiten wurden mit UV-Licht bestrahlt und direkt auf das 5 % SDS-Gel geladen. Die Proteinanalyse des 16S RNA-Gipfels ergab eine Radioaktivitätsmenge von 1000 IpM für das quervernetzte Protein S7. Bei einem Vernetzungsgrad von 30 % entspricht dies einer Gesamtmenge von Protein S7 von ungefähr 3000 IpM. Wurden jedoch im Kontrollversuch unbestrahlte 30S Untereinheiten der gleichen Behandlung unterworfen, so ergab sich nur eine Proteinmenge von ca. 20 IpM für S7, was einer "Deproteinisierung" von 99 % entspricht.

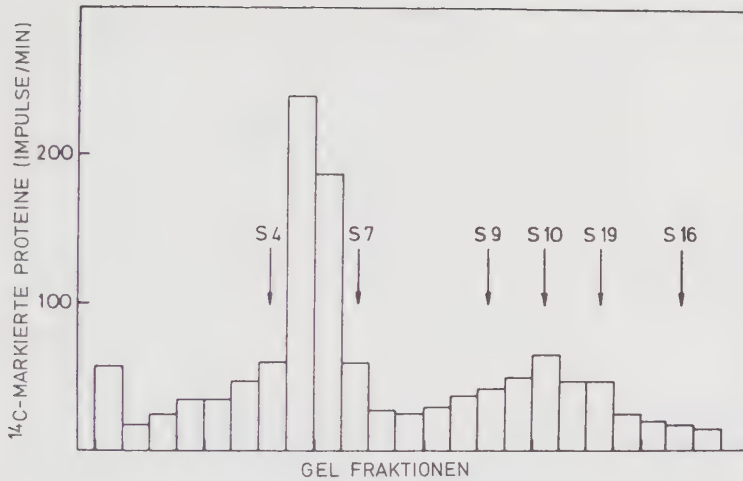


Abb. 7. Histogramm einer typischen ein-dimensionalen Proteinanalyse von quervernetzten Protein S7

Die Probe stammt aus dem S7-RNA-Komplex der Bande A (siehe Abb. 6). Die Proben wanderten von links nach rechts. Die Laufpositionen einiger 30S-Proteine sind durch Pfeile markiert. Das vernetzte Protein S7 läuft deutlich langsamer als unvernetztes.

3.4.2. Untersuchung der Bindungsstelle von Protein S7 innerhalb der RNA-Fragmente des RNP-Fragments III

Um festzustellen, in welchem der fünf RNA-Stücke von RNP-Fragment III (vgl. Abb. 16) sich die Vernetzungsstelle von Protein S7 befindet, wurden bestrahlte und unbestrahlte 30S Untereinheiten hydrolysiert (2.3.) und auf dem pH6-Gel getrennt (vgl. Abb. 1). (Das Gelsystem wurde bevorzugt, da die Trennung der RNP-Fragmente im Saccharose-Gradienten zu einer weniger guten Reproduzierbarkeit bei der Sekundärspaltung in der RNA führt.) Die entsprechenden Gelscheiben von Fragment III wurden direkt auf ein 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2.) geladen. Abb. 8 zeigt das RNA-Profil von RNP-Fragment III, das aus bestrahlten und unbestrahlten 30S Untereinheiten isoliert wurde.

Die unbestrahlte Probe ist in die erwarteten fünf RNA-Fragmente gespalten (Yuki und Brimacombe, 1975). Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Trennung auf 5 % SDS-Gelen (vgl. Abb. 6 und Kapitel 3.4.1.), ist das Elektrophorese-Profil bei der bestrahlten Probe anders als bei der unbestrahlten. Es ist eine neue Bande, genannt X, vorhanden. Die Trennung der Banden 1-4 ist nicht mehr so scharf und im Gegensatz zur unbestrahlten Kontrolle ist die Bande 1 stärker als die Bande 2.

Die Banden X, 1, 2, 2a, 3 und 4 wurden auf ihren Gehalt an quervernetztem Protein S7 untersucht (vgl. 3.4.1.). In einem typischen Versuch betrug die Radioaktivität für quervernetztes S7 in Bande X: 340 Impulse/min, in Bande 1: 200 IpM und in Bande 2: 90 IpM. Die Banden 2a und 3 zeigten im Sarkosyl-Gel eine nur sehr geringe Radioaktivität. Die Bande 4 enthielt schon freie Proteine, die die Radioaktivität des vernetzten S7 überdeckten und Bande 5 wurde aus diesem Grunde nicht analysiert.

Dieses Ergebnis führte zu zwei möglichen Erklärungen. Die wahrscheinlichste ist, daß die Bande X der gesamten RNA von RNP-Fragment III entspricht, die aufgrund der Bestrahlung nicht vollständig in die Fragmente gespalten wurde. Die Radioaktivi-

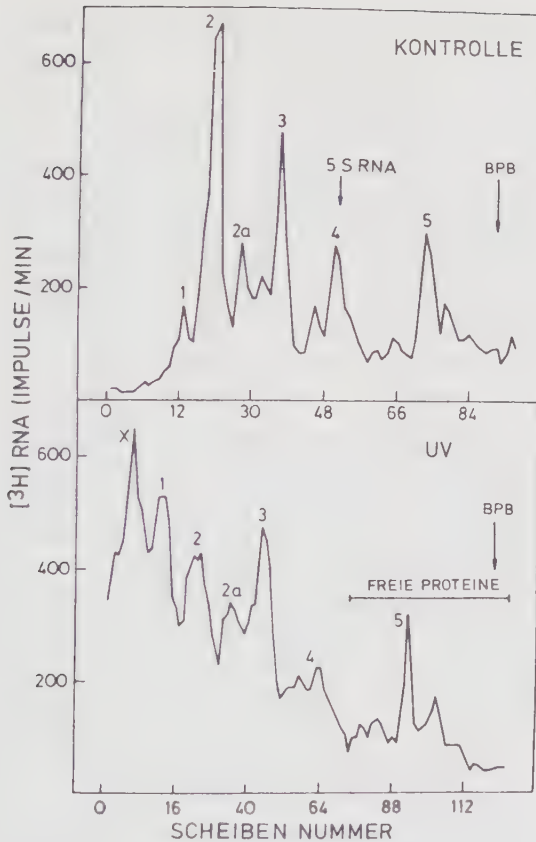


Abb. 8. Elektrophorese-Profil von RNA-Fragmenten auf einem 7 % SDS-Harnstoff-Gel

Das Bild zeigt die RNA von RNP-Fragment III ohne UV-Bestrahlung (oben) und mit UV-Bestrahlung (unten). Die BPB-Farbmarkierung sowie die 5S RNA liefen bis zu den eingezeichneten Positionen. Die Numerierung der Banden entspricht Abb. 5 (vgl. Yuki und Brimacombe, 1975). Die freien Proteine laufen innerhalb der markierten Region. (Scheibenbreite 1,7 mm)

tät in den Banden 1 und 2 weisen in diesem Fall darauf hin, daß die Vernetzungsstelle für S7 in diesem Bereich der RNA liegt (vgl. RNA-Übersichtsdiagramm Abb. 16).

Die andere Erklärung wird dadurch ermöglicht, daß bei der Trennung kleinerer RNA-Fragmente in diesem System eine Verschiebung durch das vernetzte Protein nicht ausgeschlossen werden kann. In dem Fall entspräche die Bande X dem RNA-Fragment 1 plus vernetzten S7 bzw. Bande 1 dem RNA-Fragment 2 plus S7 usw. Beide Erklärungsmöglichkeiten lassen jedoch den gleichen Schluß zu, nämlich daß die UV-induzierte Bindungsstelle von Protein S7 innerhalb der RNA-Fragmente 1 und 2 liegt (vgl. Abb. 16).

Da vernetztes S7 auch in RNA-Region B (Abb. 6) deutlich vorhanden ist und in diesem RNA-Komplex Sektion K fehlt (vgl. 3.3.), kann die S7-Bindung an RNA-Fragment 5 ausgeschlossen werden. Die Vernetzungsstelle von S7 ist damit innerhalb einer 240 Nukleotid-Sequenz (Sektion P-A) lokalisiert, da die Abwesenheit von quervernetztem Protein S7 in der Bande 3 zeigt, daß auch in der Bande 4 kein vernetztes S7 vorhanden sein kann. Fragment 4 ist ein Subfragment von 3 und konnte wegen der Überlappung mit freien Proteinen nicht analysiert werden.

3.5. Untersuchung Formaldehyd-induzierter Vernetzungsstellen von 30S Proteinen an der 16S RNA.

3.5.1. Identifizierung von Protein-RNA-Quervernetzung in "SDS-Fragmenten"

Die Behandlung ribosomaler Untereinheiten mit Formaldehyd führt in der 30S Untereinheit zur Vernetzung von fast allen Proteinen mit der 16S RNA (Möller et al., 1976). Die Gesamtmenge an vernetzten Proteinen betrug unter den beschriebenen Bedingungen 10-15 %; d.h. diese Menge konnte auch nach Behandlung mit SDS an der RNA nachgewiesen werden.

Die von Möller et al. (1976) entwickelten Vernetzungsbedingungen mit 0,03 % Formaldehyd wurden übernommen. Die Analyse

der Proteinvernetzungsstellen in RNA-Fragmenten erfolgte grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip wie bei der Arbeit mit UV-Licht (3.4.). Im Gegensatz zur Quervernetzung mit UV-Licht sind jedoch die durch Formaldehyd gebildeten Protein-RNA-Komplexe relativ instabil, und die Reaktion ist reversibel (Möller et al., 1976). Um diesen Prozeß zurückzudrängen, wurde während des gesamten Analysenganges die Formaldehyd-Konzentration von 0,03 % beibehalten und außerdem so schnell wie möglich gearbeitet.

^3H und ^{14}C -markierte 30S Untereinheiten wurden in Gegenwart von 5 mM Magnesium, 50 mM Kalium und 25 mM Triäthanolamin-Puffer mit 0,03 % Formaldehyd 1 Stunde bei 37°C inkubiert (2.6.). Nach Zugabe von Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 2 M wurden die Untereinheiten mit RNase T_1 hydrolysiert und die RNP-Fragmente auf einem pH6-Gel getrennt. Eine Kontrolle ohne Formaldehyd wurde auf die gleiche Weise untersucht.

Abb. 9A zeigt eine typische Spaltung Formaldehyd-vernetzter 30S Untereinheiten in die drei bekannten RNP-Fragmente I - III (vgl. Abb. 1). Die Kontrolle zeigte das gleiche Spaltungsprofil. Zur Abtrennung der freien, nicht vernetzten Proteine von den Protein-RNA-Komplexen wurden die entsprechenden Gel-scheiben der RNP-Fragmente I-III (Abb. 9A) auf ein 5 % SDS-Gel mit 0,03 % Formaldehyd (2.6.) geladen.

Abb. 9B-9D zeigen das elektrophoretische Profil der RNA der RNP-Fragmente I - III. Da Fragment I der gesamten 30S Untereinheit entspricht, läuft der dazugehörige RNA-Komplex nur knapp ins Gel (Abb. 9B). Die RNA von Fragment II (Abb. 9C) bzw. III (Abb. 9D) läuft als ein Komplex (vgl. Abb. 6). Die nicht mit Formaldehyd behandelte Kontrolle zeigten ein identisches elektrophoretisches Verhalten.

Zur Analyse der vernetzten Proteine in den RNA-Komplexen wurden die entsprechenden SDS-Gel-Scheiben von I, II und III (Abb. 9B-D) zusammen mit unmarkierten 30S Untereinheiten auf 17 - 23 % Sarkosyl-Gradient-Gele geladen (2.3.). Nach dem Färben wurde jeweils die Radioaktivität des ganzen Gels bestimmt. Bemerkenswert ist, daß im Startbereich der Gele keine wesent-

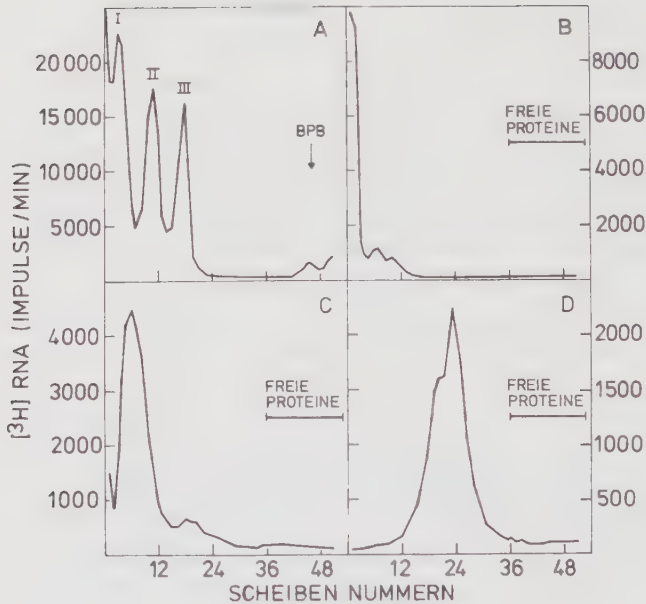


Abb. 9. A: Hydrolyse-Profil $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierter 30S Untereinheiten (nach Formaldehyd- und RNase T_1 -Behandlung) im pH6-Gel-System.

Die ungespaltene 30S Kontrolle lief wie die Bande I. Das Profil der ^{14}C -markierten Proteine entspricht dem der (^3H)RNA. Bromphenolblau lief bis zur markierten Position.

B, C, D: RNA-Profile der Fragmente I, II und III in einem 5 % SDS-Gel nach Auftragung der entsprechenden pH6-Gelscheiben (vgl. Abb. 9A)

Die freien Proteine liefen als breiter Komplex innerhalb der markierten Region. Bromphenolblau lief bis Fraktion 60.

(Scheibenbreite 1,7 mm)

liche Radioaktivität entdeckt wurde, was auf eine Aggregation von vernetzten Proteinen hingewiesen hätte.

Da im Sarkosyl-System nicht alle Proteine eindeutig identifiziert werden können, wurden die Protein-RNA-Komplexe (Abb. 9B-D) auch aus den Gelscheiben extrahiert (2.7.) und zusammen mit unmarkierten 30S Untereinheiten der 2D-Elektrophorese (2.2.4.) unterworfen. Nach dem Färben und Entfärben wurde die Radioaktivität der gefärbten Gelflecken bestimmt. Sowohl in der 2D-Elektrophorese, als auch im Sarkosyl-System konnte keine Wanderungsänderung der quervernetzten Proteine festgestellt werden (vgl. auch Möller et al., 1976).

In den Proteinflecken wurde ungefähr 30-50 % der erwarteten Radioaktivität wiedergefunden. Da jedoch die gleichen Proteine wie im Sarkosyl-System identifiziert wurden, muß dieser Radioaktivitätsverlust auf einer Eigenschaft des Analyse-Systems beruhen, und ist kein spezifischer Verlust quervernetzter Proteine aufgrund von Aggregation. Diese Erklärung wird auch durch die Ergebnisse im Sarkosyl-System unterstützt, in dem ebenfalls keine Aggregation vernetzter Proteine beobachtet werden konnte (siehe oben).

Die Kombination beider Systeme ermöglichte die eindeutige Identifizierung der quervernetzten Proteine. Nur Protein S9 konnte nicht von S11 unterschieden werden, da S11 zwei Flecke in der 2D-Elektrophorese zeigte, von denen einer die gleiche Laufposition wie S9 hat (Wittmann et al., 1971). Im Sarkosyl-System waren S9 und S11 ebenfalls nicht unterscheidbar (Yuki und Brimacombe, 1975).

In allen drei Fragmenten wurde eine Anzahl unterschiedlich stark vernetzter Proteine gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Alle in RNP-Fragment I vernetzten Proteine tauchen entweder in RNP-Fragment II oder III auf mit Ausnahme von S21. Der Gehalt an vernetzten Proteinen in RNP-Fragment I entspricht weitgehend den Ergebnissen von Möller et al. (1976). Eine Ausnahme bildet S21, das im Gegensatz zu meinen Ergebnissen in den Untersuchungen von Möller et al. (1976) das am stärk-

Tabelle 2

Verteilung der Formaldehyd-vernetzten Proteine zwischen den RNA-Komplexen der RNP-Fragmente I, II und III (Abb. 9)
(Die Daten sind aus 5 unabhängigen Versuchen zusammengefaßt.)

30S Proteine	Vernetzung an der RNA der RNP-Fragmente		
	I	II	III
S2	-	-	-
S3	+++	+++	(+)
S4	+	+	++
S5	++	+++	(+)
S6	-	-	-
S7	+	+	+
S8	-	-	-
S9 (11)	++	++	++
S10	-	-	-
S12	+	+	-
S13	++	++	++
S14	++	(+)	+
S15	(+)	-	-
S16 (17)	-	-	-
S18	+	+	-
S19	(+)	(+)	(+)
S20	-	-	(+)
S21	++	-	-

Symbole: +++ = ^{14}C -Radioaktivität von 150-250 Impulse/Min
 ++ = 80-150 Impulse/Min
 + = 50-80. Impulse/Min
 (+) = 20-30 Impulse/Min
 - = keine Radioaktivität

sten vernetzte Protein an der 16S RNA ist. Dieser Unterschied könnte auf der variablen Reversibilität der Vernetzung während des Analysenganges beruhen. Drei Proteine, nämlich S4, S7 und S13 haben Vernetzungsstellen an der RNA von RNP-Fragment II und III, was darauf hinweist, daß diese Proteine mehrere Kontaktpunkte mit der 16S RNA haben. Die Bindungsstelle von Protein S9 (11) konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da es in beiden RNA-Komplexen (II und III) vorkommt. Es besteht die Möglichkeit, daß jeweils nur eines der beiden Proteine S9 oder S11 an einem der genannten RNA-Komplexe bindet.

Die übrigen Proteine, d.h. S3, S5, S12, S14 und S18 zeigen jeweils nur eine Vernetzungsstelle im RNP-Fragment II oder III (siehe Abb. 13).

3.5.2. Identifizierung der Proteinvernetzungsstellen in "Harnstoff-Fragmenten"

Um die Proteinvernetzungsstellen innerhalb der RNP-Fragmente II und III näher zu identifizieren, wurden entsprechende Gelscheiben des pH6-Gel-Systems (Abb. 9A) auf ein 5 - 15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoffschicht (2.2.2.) geladen. Dieses Gel wurde entwickelt, da die Probe in diesem System nur einen kurzzeitigen Kontakt mit dem Harnstoff hat, der ausreicht, die versteckten Spaltungen in der RNA sichtbar zu machen. Längerer Kontakt, wie z.B. im 7 % SDS-Harnstoff-Gel (vgl. 3.4.2.), bewirkt den totalen Verlust der Formaldehyd-vernetzten Proteine von den RNA-Fragmenten.

Abb. 10B zeigt die Trennung der RNA-Fragmente der Bande III (Abb. 9A) nach Formaldehydbehandlung. Im oberen Bild (Abb. 10A) ist die Trennung ^{32}P -markierter RNA-Banden von Fragment III (ohne Formaldehydbehandlung) im gleichen System zu sehen (vgl. 3.6.).

Das neue Gelsystem bewirkt eine verbesserte, sehr scharfe Trennung der fünf ^{32}P -markierten RNA-Fragmente (Abb. 10A) im Vergleich zum alten System (Yuki und Brimacombe, 1975). Die "Fingerprint"-Analyse der Banden (3.6.) zeigte, daß die Se-

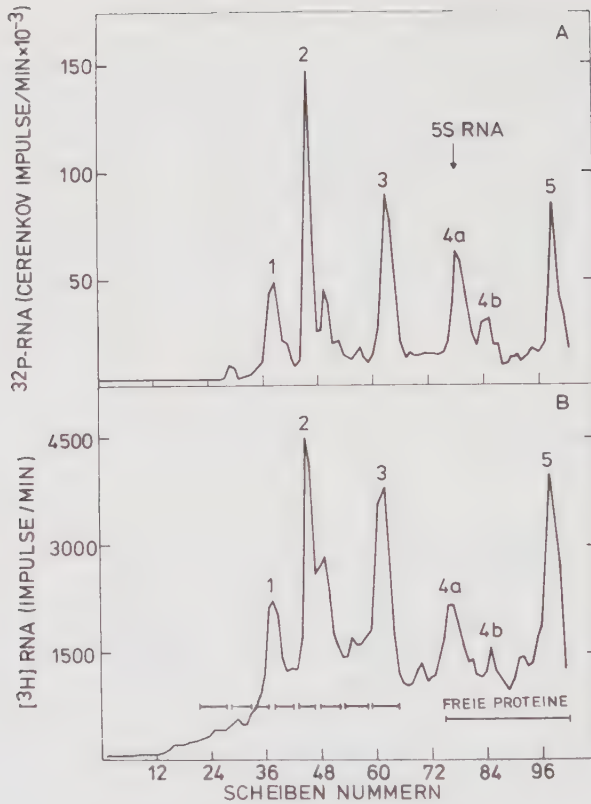


Abb. 10. RNA-Profil von RNP-Fragment III nach Elektrophorese in einem 5-15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoff-Schicht

A: RNA III aus ^{32}P -markierten 30S Untereinheiten.

Die Laufposition der 5S RNA ist markiert. Die Nummerierung der Banden erfolgte nach Yuki und Brimacombe (1975) (vgl. Abb. 8).

B: RNA III aus $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierten 30S Untereinheiten nach Formaldehyd-Behandlung

Die waagerechten Striche kennzeichnen die Gelfractionen, die auf vernetzte Proteine untersucht wurden. Die Laufposition der freien Proteine ist markiert.

(Scheibenbreite jeweils 1,7 mm)

quenzen der RNA-Fragmente mit den im alten System gefundenen identisch sind. Das gleiche Elektrophorese-Profil weist die mit Formaldehyd behandelte RNA von Fragment III auf, jedoch mit weniger scharfer Trennung.

Abb. 11 zeigt die Trennung der RNA-Fragmente von RNP-Fragment II (Abb. 9A).

Im oberen Bild (Abb. 11A) ist wiederum die Trennung ^{32}P -markierter RNA-Fragmente ohne Formaldehyd-Behandlung zu sehen. Die scharfen nummerierten Banden wurden mit Hilfe der Oligonukleotid-Analyse identifiziert (siehe nächstes Kapitel). Im Gegensatz zur Spaltung der Formaldehyd-vernetzten RNA-Fragmente der Bande III (Abb. 10B) ist die Trennung der RNA-Fragmente der Bande II in Gegenwart von Formaldehyd stark beeinträchtigt (Abb. 11B). Die Trennung der Banden 1 - 5 (Abb. 11A) ist vollständig verlorengegangen; nur die RNA-Fragmente 6, 7 und 8 zeigen noch relativ saubere Banden. Die Banden 1 - 5 sind jedoch in Abwesenheit von Formaldehyd (11A) sehr scharf und dicht benachbart, was bewirkt, daß diese Banden bei einer weniger deutlichen Trennung zusammenlaufen. Da die RNA-Fragmente 1 - 5 aber alle verwandt sind, d.h. ihr 5'-Ende stimmt jeweils weitgehend mit dem 5'-Ende der 16S RNA überein (siehe 3.6. und Abb. 16), bestand noch die Möglichkeit einer sinnvollen Proteinanalyse in diesem Bereich der RNA.

Weil die freien, nicht mit Formaldehyd vernetzten Proteine sich im Gel mit den kleineren RNA-Fragmenten überlappen (Abb. 10B, 11B), konnten letztere nicht auf ihren Gehalt an vernetzten Proteinen untersucht werden.

Zur Bestimmung der gebundenen Proteine in den RNA-Fragmenten der Banden II und III wurden die Gelscheiben entsprechend der eingezeichneten waagerechten Striche (Abb. 10B, 11B) zusammengefaßt. Die quervernetzten Proteine wurden aus den Protein-RNA-Komplexen extrahiert und in der zwei-dimensionalen Proteinanalyse identifiziert (vgl. 3.4.2. und 2.7.). In Abb. 12 sind einige der erhaltenen Protein-Histogramme zu sehen, d.h. von S4, S7, S9(11), S13 und S14 aus Fragment III und von S3 aus Fragment II. Die Position der RNA-Banden (Abb. 10B,

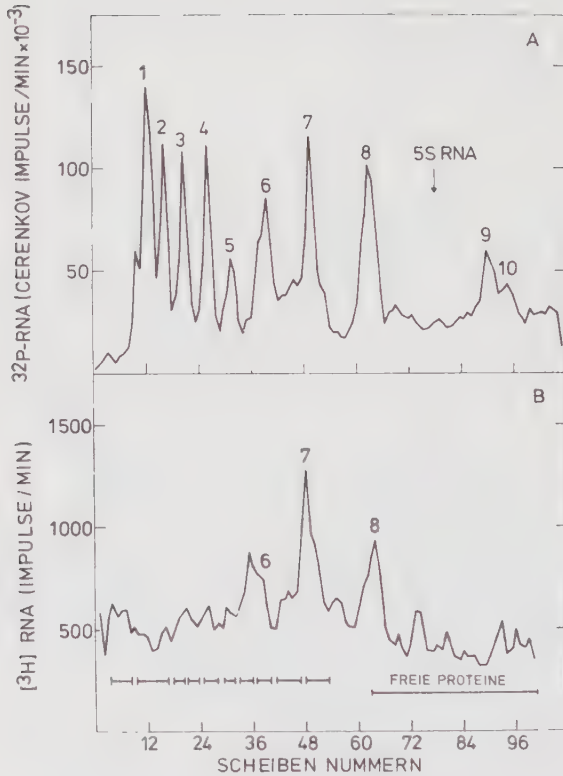


Abb. 11. RNA-Profil von RNP-Fragment II nach Elektrophorese in einem 5 - 15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoff-Schicht

A: RNA II aus ^{32}P -markierten 30S Untereinheiten

B: RNA II aus $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -markierten 30S Untereinheiten nach Formaldehyd-Behandlung

Die waagerechten Striche kennzeichnen die Gelfraktionen, die auf vernetzte Proteine untersucht wurden. (vgl. Abb. 10)

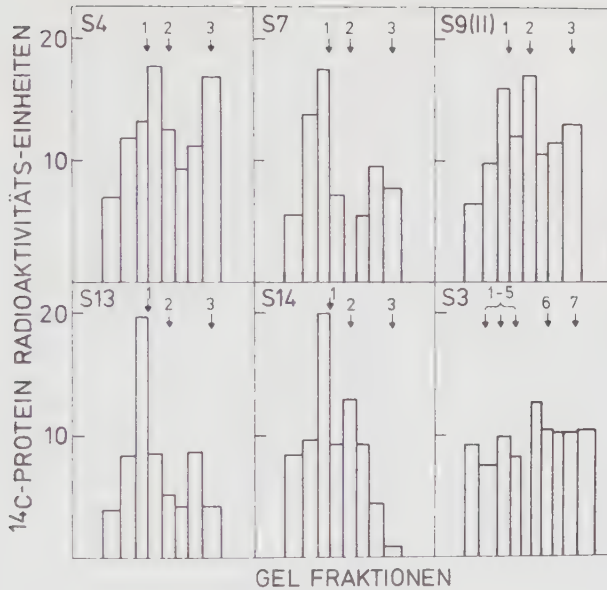


Abb. 12. Histogramm quervernetzter, ^{14}C -markierter Proteine
Die Proteine S4, S7, S9(11), S13 und S14 stammen aus dem RNP-Fragment III, Protein S3 aus RNP-Fragment II.
Die Proteine wurden aus den RNA-Fractionen entsprechend der markierten Bereiche in Abb. 10B und 11B extrahiert und in der 2D-Elektrophorese identifiziert. Die verschiedene Breite der senkrechten Balken entspricht der unterschiedlichen Anzahl extrahierter Gelscheiben in einer RNA-Fraktion (Abb. 10B und 11B). Die Höhe eines Balkens entspricht der Radioaktivitätsmenge einer Gelfraktion dividiert durch die Anzahl der Gelscheiben in dieser Fraktion. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der RNA-Banden aus Abb. 10B und 11B.

11B) ist durch die Pfeile markiert.

Wie schon im Falle des mit UV-Licht quervernetzten S7 erwähnt (3.4.2.), kann eine Verschiebung von RNA-Fragmenten durch quervernetzte Proteine nicht ausgeschlossen werden.

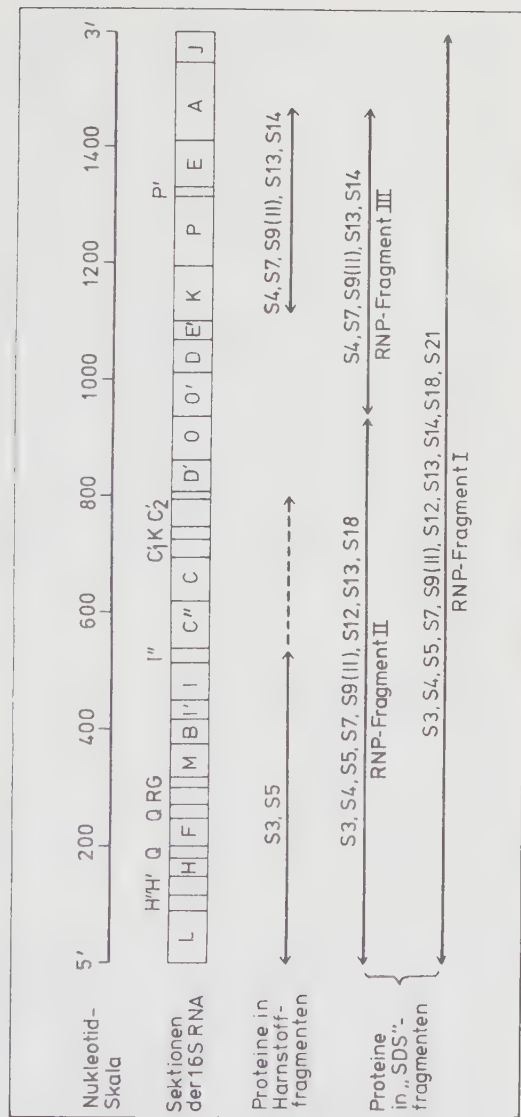
Wenn man von dieser Möglichkeit absieht, ergeben die Proteinanalysen der vernetzten Proteine-RNA-Komplexe von Fragment III (Abb. 10B) folgendes Bild: Protein S7, S13 und S14 zeigen Radioaktivitätsmaxima im Bereich des RNA-Fragments 1, das der Sektion K - A der 16 S RNA entspricht (siehe Abb. 16 und Yuki und Brimacombe, 1975). Protein S14 zeigt außerdem noch einen weiteren Radioaktivitätsanstieg in RNA-Fragment 2, einem Subfragment von RNA-Fragment 1 (Sektion P - A). Unterstellt man eine Verschiebung der RNA-Fragmente durch die oben genannten Proteine, so würde beispielsweise das Radioaktivitätsmaximum von S7 im Bereich von RNA-Fragment 1 von dem verschobenen RNA-Fragment 2 stammen. Der Bindungsbereich der vernetzten Proteine bleibt gleich.

Protein S4 hat ebenfalls Radioaktivitätsmaxima im Bereich der RNA-Fragmente 1 und 2 sowie ein weiteres im Bereich von RNA-Fragment 3 (Sektion O' - D) (Yuki und Brimacombe, 1975). Da sich die Laufposition von RNA-Fragment 3 jedoch in der Nähe der freien Proteine befindet (Abb. 10B), besteht die Möglichkeit, daß die in RNA-Fragment 3 gefundene Radioaktivität schon vom freien S4 stammt. (S4 ist das größte Protein aus dem RNP-Fragment III). Protein S9(11) hat ebenfalls Maxima in den RNA-Fragmenten 1 und 2. Da jedoch insgesamt keine deutliche Radioaktivitätsverteilung zwischen den einzelnen RNA-Fragmenten erreicht wurde, ist es nicht möglich zu sagen, ob das Protein auch in RNA-Fragment 3 (Sektion O' - D) vernetzt ist.

Zusammenfassend ergibt sich, daß alle fünf Proteine wenigstens eine Vernetzungsstelle in Sektion K - A der 16S RNA haben.

Im Gegensatz zu den obenbeschriebenen Ergebnissen führte die Proteinanalyse der Protein-RNA-Komplexe von Fragment II (Abb. 11B) nur zu zwei deutlich identifizierbaren Proteinen, nämlich S3 und S5. Beide Proteine sind über die gesamten RNA-Fragmente 1 - 7 verteilt. Als Beispiel dient S3 in Abb. 12.

Abb. 13. Zusammenfassung der Verteilung der 30S-Proteine an der 16S RNA nach Formaldehyd-Behandlung
Die Einteilung der 16S RNA in Sektionen erfolgte nach Ehresmann et al. (1975).



Da jedoch alle folgenden RNA-Fragmente (2 - 7) Subfragmente von 1 sind (vgl. nächstes Kapitel), liegen die Vernetzungsstellen von Protein S3 und S5 auf jeden Fall im RNA-Fragment 1, d.h. einer 800 Nukleotid-Sequenz, die am 5'-Ende der 16S RNA beginnt. Die Tatsache, daß S3 und S5 auch in den RNA-Fragmenten 3, 4 und 5 vorhanden sind, in den jeweils die Sektionen C" - C₂' fehlen, ermöglicht es, den Vernetzungsbereich weiter einzugrenzen, nämlich auf ein 500 Nukleotid-Stück von 5'-Ende der 16S RNA.

Abb. 13 gibt eine Zusammenfassung der RNA-Bindungsgebiete für die verschiedenen Proteine nach Formaldehyd-Vernetzung.

Es zeigt sich, daß die Vernetzungsstellen der Proteine weitgehend in zwei RNA-Regionen lokalisiert sind. Das 3'-Ende der 16S RNS (Sektion A - J) wurde weder in RNP-Fragment II noch in III gefunden (siehe nächstes Kapitel). (Versuche in unserer Gruppe haben gezeigt, daß das 3'-Ende der 16S RNA nach der Standard-Hydrolyse der 30S Untereinheiten als freie RNA läuft.)

3.6. Oligonukleotid-Analyse der RNA im RNP-Fragment II

Wie schon erwähnt, führte die RNA-Analyse des RNP-Fragments III zu fünf definierten RNA-Fragmenten (Yuki und Brimacombe, 1975). Eine ähnlich detaillierte Untersuchung des RNA-Gehaltes von RNP-Fragment II wurde notwendig, um die Bindungsgebiete quervernetzter Proteine an einzelnen RNA-Fragmenten näher bestimmen zu können (vgl. 3.5.2.).

Dazu wurden ³²P-markierte 30S Untereinheiten der Standard-Hydrolyse unterworfen (siehe 2.3.) und auf dem pH6-Gel (2.2.1.) getrennt. Die Spaltung ist identisch mit der von ³H/¹⁴C-markierten 30S Untereinheiten (vgl. Abb. 1 und 9A). Anschließend wurde die RNA der RNP-Fragmente II und III mit Hilfe von Phenol aus den Gelscheiben extrahiert (2.8.) und auf einem 5 - 15 % SDS-Gradient-Gel mit Harnstoffschicht (2.2.2. und vgl. 3.5.2.) getrennt, oder es wurden die Gelscheiben mit den RNP-Fragmenten direkt auf das Gel geladen.

Das Elektrophorese-Profil der RNA II ist in Abb. 11A zu sehen (siehe 3.5.2.). Es zeigt sich eine deutliche Trennung in zehn

scharfe Banden (1-10). Kleinere, wenig reproduzierbare Komponenten sind im Bereich des 5S RNA-Markers zu sehen. Die Nummerierung der RNA-Banden erfolgte aufgrund ihrer Wanderung im Gel. Die RNA jeder markierten Bande wurde mit Hilfe von Phenol (2.8.) aus den Gelscheiben extrahiert und der Oligonukleotid-Analyse unterworfen (2.10). Phenol-extrahierte Gesamt-RNA II wurde ebenfalls untersucht.

Als Beispiel einer zwei-dimensionalen Oligonukleotid-Trennung ist in Abb. 14A die Autoradiographie des "Fingerprints" von RNA-Fragment 1 wiedergegeben. Die Nomenklatur der Oligonukleotid-Flecken richtet sich nach Uchida et al. (1974) und ist im Oligonukleotid-Diagramm (Abb. 14B) angegeben (vgl. 3.2.3.). Das Diagramm zeigt alle Flecken, die auch in der unfraktionierten RNA II vorhanden sind. Der schraffierte Fleck 4 - 14 fehlt in Fragment 1.

Die weitere Untersuchung derjenigen T_1 -Produkte, die nicht aufgrund ihrer Laufposition im Fingerprint eindeutig identifiziert werden konnten, erfolgte mit Hilfe einer zweiten Spaltung mit RNase A (2.10.). Der Vergleich der Ergebnisse der Sekundäranalyse mit den erwarteten Sequenzen der T_1 -Produkte führte zur eindeutigen Identifizierung einer Reihe von Oligonukleotiden. Der Bereich, den die RNA-Fragmente innerhalb der 16S-RNA umfassen, kann anschließend durch Vergleich von charakteristischen Oligonukleotiden mit der Gesamtsequenz der 16S RNA (Fellner et al., 1972) lokalisiert werden, da "Harnstoff"-Fragmente eine ununterbrochene Sequenz haben. Charakteristische Oligonukleotide sind solche, die nur einmal innerhalb der 16S RNA vorkommen (z.B. 2-11a, 6-11, 49). Da in keinem der untersuchten RNA-Fragmente spezifische Oligonukleotide von RNA III (Sektion O'-A) gefunden wurden, kann eine Verunreinigung mit diesem Bereich der 16S RNA ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund wurden auch solche Oligonukleotide als charakteristisch bezeichnet, die außerhalb der RNA II (Sektion L - O) noch einmal in den RNA-Fragmenten von RNP-Fragment III vorkommen (z.B. 24d, o5e, o5a). Oligonukleotide des 3'-Endes der 16S RNA (Sektion A-J) konnten ebenfalls nicht entdeckt werden. Alle untersuchten Fragmente stammen aus der Sektion L-O der 16S RNA. Die Liste der identifizierten charakteristi-



Abb. 14A. Autoradiographie eines Fingerprints von RNA-Fragment 1

Die Elektrophorese lief in der 1. Dimension von rechts nach links, in der 2. Dimension von oben nach unten. Das Diagramm (nächste Seite) zeigt die Nomenklatur der Flecken nach Uchida et al. (1974). Der schraffierte Fleck 4-14 ist nur in der unfraktionierten RNA II vorhanden.

(o3b,c: Mischung aus o3b + o3c; o5a-c: Mischung aus o5a + o5b + o5c; in 29 sind mehrere Isomeren vorhanden).

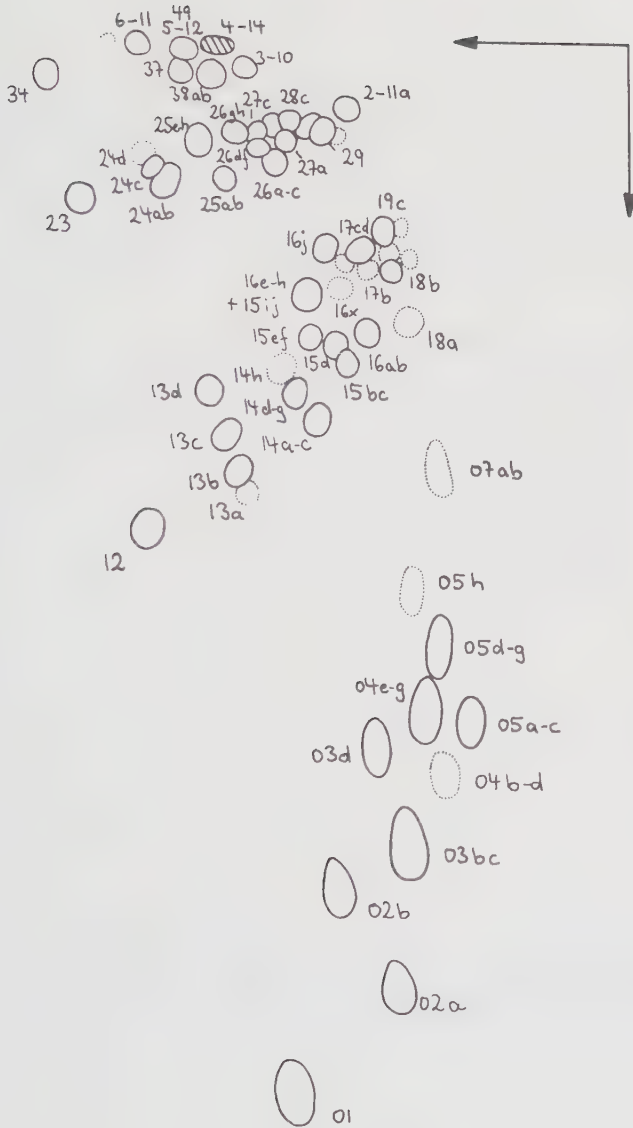


Abb. 14B: Oligonukleotid-Diagramm (siehe Abb. 14A)

schen Oligonukleotide dieses Bereiches der 16S RNA befindet sich in Tabelle 3.

Die Reihenfolge der Oligonukleotide in der Tabelle entspricht ihrem Vorkommen in der 16S RNA von Sektion L -O. Die Nomenklatur ist mit der im Fingerprint (Abb. 14B) zu vergleichen. Die waagerechten Striche unter der Sequenz der T₁-Oligonukleotide markieren die RNase A Produkte. Die Tabelle enthält auch das molare Verhältnis der einzelnen Oligonukleotide innerhalb eines jeden RNA-Fragmentes und der unfractionierten RNA II.

Aufgrund der Abwesenheit bzw. des submolaren Vorkommens charakteristischer Oligonukleotide gegenüber der gesamten RNA II wurde der Bereich bestimmt, den jedes RNA-Fragment umfaßt. Da in manchen Sektionen der 16S RNA, z.B. Sektion D', wenig charakteristische Oligonukleotide vorhanden sind, konnte das 3'-Ende mancher Fragmente nicht eindeutig bestimmt werden. Die gefundenen molaren Mengen nicht-charakteristischer Oligonukleotide stimmen jedoch mit den erwarteten Mengen für die jeweils angenommene Fragment-Sequenz überein.

Die ungefähre Bestimmung der Kettenlänge der RNA-Fragmente erfolgte außerdem aufgrund ihrer Wanderung im Gel (Abb. 11A). Als Vergleich dienten die RNA-Banden des RNP-Fragments III (Abb. 10A), die in der Oligonukleotid-Analyse die gleichen Sequenzen zeigen wie die von Yuki und Brimacombe (1975) beschrieben. Die durch die Wanderung ermittelten Kettenlängen stimmen mit den in der Oligonukleotid-Analyse ermittelten weitgehend überein.

RNA II-Fragment 6 (Abb. 11A) zeigt beispielsweise die gleiche Wanderung (Fraktion 36 - 42) wie RNA III-Fragment 1 (Abb. 10A) (ungefähr 300 Nukleotide). Die in der Oligonukleotid-Analyse ermittelte Kettenlänge von RNA II-Fragment 5 beträgt 260-300 Nukleotide.

Tabelle 3: Katalog charakteristischer Oligonukleotide aus dem Bereich der RNA von RNP-Fragment II

Die Bezeichnung der RNA-Fragmente entspricht Abb. 11A.

Die Nomenklatur der Flecke (Spalte 2) entspricht Abb. 14 und die Sequenz der Oligonukleotide (Spalte 3) sowie ihre Lokalisierung in den Sektionen (Spalte 1) entsprechen der von Ehresmann et al. (1975). Die RNase A-Produkte sind durch die Striche unter den Oligonukleotid-Sequenzen markiert. Für jedes Oligonukleotid ist die molare Menge pro Mol RNA (vgl. 2.10) angegeben. Eingeklammerte Werte kennzeichnen Oligonukleotide, die aufgrund der Kettenlängenbestimmung der Fragmente Verunreinigungen sind.

RNA-Sektion	Fleck Nummer	Sequenz der RNase T ₁ - und A-Produkte	Anzahl der Oligonukleotide in den RNA-Fragmenten (mol/mol)										
			Total II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L	24d	<u>AUUG</u>	1.7	1.0	-	1.4	-	0.9	0.6	-	(0.4)	1.4	0.3
L	2-11a	<u>C(C.V)AACACAUG</u>	0.8	0.7	-	1.1	-	0.6	0.5	(0.1)	-	0.5	0.3
H'	16j	<u>AAACUG</u>	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	0.9	0.8	0.5	-	-	-
H	3-10	<u>AUAACACUUG</u>	0.7	1.1	1.2	0.9	1.0	0.9	0.7	0.5	-	-	-
F	16b	<u>CCAUCCG</u>	0.9	1.1	1.3	1.3	0.9	0.7	0.5	0.5	-	-	-
F	o5c	<u>CCCAAG</u>	0.8	1.2	1.1	0.9	1.2	0.7	0.8	0.6	-	-	-
Q	15e	<u>UAACG</u>	0.8	1.0	1.1	0.9	1.0	0.6	0.6	0.4	-	-	-
M	o5e	<u>ACGAG</u>	0.8	1.6	1.2	1.4	1.5	1.2	-	(0.2)	-	-	-
M	18b	<u>CACCACUG</u>	0.7	0.8	1.0	1.0	0.8	0.5	(0.3)	(0.2)	-	-	-
M	o5f	<u>ACACG</u>	0.7	1.6	1.2	1.4	1.5	1.2	(0.8)	(0.2)	-	-	-
B	15d	<u>CCAUUG</u>	0.6	1.5	1.4	1.8	1.4	0.9	-	(0.3)	0.6	-	-
I'	24c	<u>UAUG</u>	1.0	1.3	1.9	1.6	1.5	0.7	(0.3)	(0.4)	0.9	-	(0.1)
I	6-11	<u>UCUAAUACUUG</u>	1.1	1.5	1.5	1.4	1.3	(0.4)	(0.1)	(0.2)	0.6	(0.1)	-
I	o5a	<u>C(C.A)CG</u>	0.8	1.2	1.1	0.9	1.2	(0.6)	-	-	0.6	-	-
I''	49	<u>UACUUUCAG</u>	1.3	1.3	1.4	1.6	1.3	(0.4)	(0.1)	(0.2)	0.7	(0.1)	-
C	19c	<u>AAAUCCCGG</u>	1.2	1.1	1.0	(0.4)	-	(0.3)	(0.3)	(0.2)	(0.3)	-	-
C'2	18a	<u>CCCCCUUG</u>	1.3	0.4	-	-	-	(0.2)	(0.1)	(0.2)	-	(0.2)	0.3
C'2	14h	<u>ACUG</u>	1.6	1.3	-	-	(0.3)	(0.3)	(0.3)	(0.4)	-	0.5	0.4
O	4-14	<u>UUAACACUCAACG</u>	1.4	(0.1)	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.2
O	14d	<u>UACG</u>	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.3

* 16j ist mit RNase A nicht trennbar von 16h (UAACG) aus Sektion D

Außer der direkten Trennung der RNA-Fragmente wurde die RNA II in zwei Stufen fraktioniert, um mögliche Tertiärwechselwirkung in diesem Gebiet der RNA zu entdecken (vgl. 3.3.). Dazu wurden Gelscheiben, die das RNP-Fragment II enthalten, zuerst auf ein 5 % SDS-Gel (2.2.2.) geladen. In diesem System können nur RNA-Stücke getrennt werden, die nicht durch Sekundär- oder Tertiärwechselwirkung aneinander gebunden sind. Die Auftrennung der RNA II in diesem System ist in Abb. 15 zu sehen.

Die RNA ist in eine Anzahl verschieden scharfer Banden getrennt; die beiden Hauptbanden werden als S1 und S3 bezeichnet (vgl. auch Abb. 6 und Abb. 9). Die RNA-Fragmente wurden anschließend durch direktes Auftragen der Scheiben oder nach Phenolextraktion auf ein 7 % SDS-Harnstoff-Gel (2.2.2.) gebracht. Die Fragmente S1 und S3 wurden dabei in weitere Banden getrennt. Diese RNA-Fragmente wurden mit Phenol extrahiert und wie beschrieben mit Hilfe der Oligonukleotid-Analyse identifiziert (2.10.).

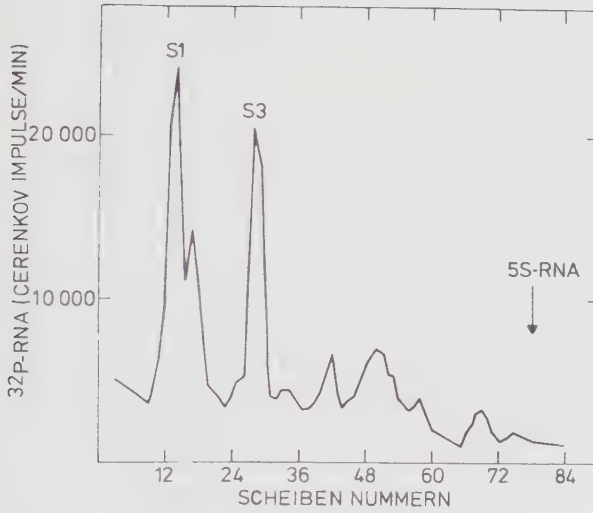


Abb. 15. Elektrophorese-Profil der ^{32}P -markierten RNA von RNP-Fragment II nach direkter Auftragung der Scheiben auf ein 5 % SDS-Gel

Die weiter untersuchten RNA-Banden und die Position der 5S RNA sind gekennzeichnet.

(Scheibenbreite 1,7 mm)

Die Zusammenfassung aller Daten der untersuchten RNA-Fragmente befindet sich in Abb. 16.

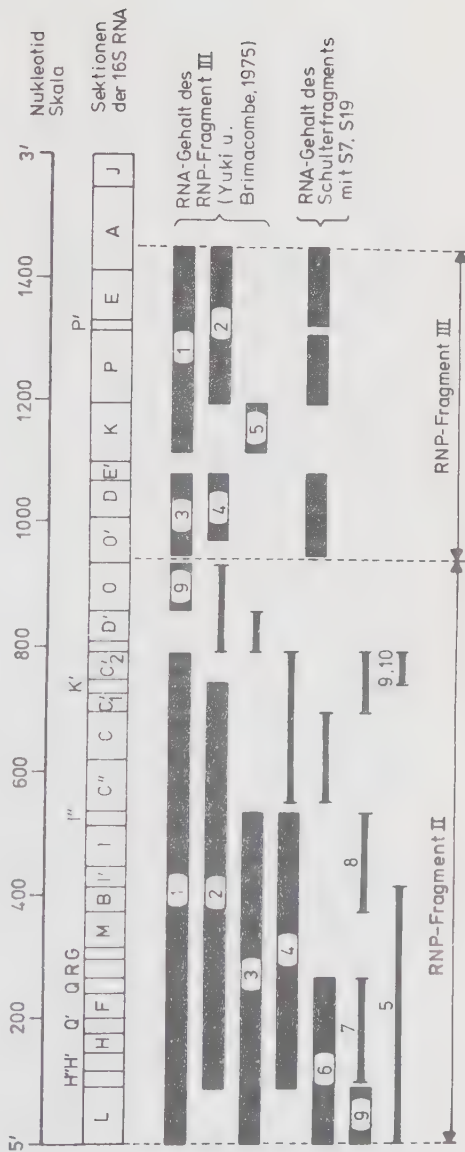
Die durch dicke Balken markierten RNA-Fragmente 1, 2, 3, 4, 6 sowie das als Mischung identifizierte Fragment 9 wurde sowohl bei der einstufigen als auch bei der zweistufigen Trennung der RNA II gefunden. Die im einstufigen Verfahren isolierten RNA-Fragmente 5, 6, 7 und 8 enthielten submolare Mengen anderer Nukleotide (siehe Tab. 3), die aufgrund der Kettenlängenbestimmung als Verunreinigung gelten können. Die RNA-Fragmente 5, 7 und 8 waren nur schwach und nicht sehr reproduzierbar vorhanden. Sie tauchten in der zweistufigen RNA-Analyse nicht auf. Die RNA-Fragmente 9 und 10 sind jeweils Mischungen aus drei kurzen Nukleotid-Sequenzen der Sektionen L, C² und O.

Die zweistufige RNA-Fraktionierung ergab neben den schon erwähnten RNA-Fragmenten noch eine Anzahl kleinerer Fragmente, die in der einstufigen Analyse der RNA II nicht gefunden wurden. Diese Fragmente sind in Abb. 16 durch die nicht nummerierten waagerechten Striche markiert. Es besteht die Möglichkeit, daß sich diese Fragmente, die alle innerhalb der Sektion C² - O zu sehen sind, im nicht-untersuchten Gelbereich (Fraktion 67-85) des 5 - 15 % SDS-Gradient-Gels (Abb. 11A) befinden. Diese Möglichkeit wird dadurch wahrscheinlich, daß die bei der einstufigen Fraktionierung gewonnenen RNA-Fragmente überwiegend die Sektionen L - I² umfassen.

Eine Tertiärwechselwirkung zwischen weit auseinanderliegenden RNA-Fragmenten konnte mit Hilfe der zweistufigen RNA II-Analyse im Gegensatz zur RNA III (3.3.) nicht entdeckt werden. Die Untersuchung der S-Fragmente (Abb. 15) zeigte, daß S1 der gesamten RNA II entspricht; d.h. alle in der 2. Stufe (7 % SDS-Harnstoff-Gel) gefundenen Fragmente von S1 sind auch in der RNA II enthalten. Das Fragment S3 (Abb. 15) enthält dagegen nur die RNA-Fragmente 3 und 4 (Abb. 16) in deutlichen Mengen. Die übrigen kleineren Banden, die im 7 % SDS-Harnstoff-Gel beobachtet wurden, waren nicht sehr reproduzierbar und sind daher noch nicht eindeutig identifiziert.

Abb. 16. Übersichtsdiagramm aller RNA-Sequenz-Ergebnisse

Die Einteilung der 16S RNA in Sektionen erfolgte nach Ehresmann et al. (1975). Im 3'-Bereich der 16S RNA befinden sich die RNA-Fragmente 1 - 5 des RNP-Fragments III (Yuki und Brimacombe, 1975), und darunter sind die 3 RNA-Fragmente des "Schulterfragmentes" eingezeichnet (vgl. Kapitel 3.2.3. und Abb. 5). Im 5'-Bereich der 16S RNA sind die RNA-Fragmente des RNP-Fragments II aufgeführt. Die breiten nummerierten Balken kennzeichnen RNA-Sequenzen, die in der ein- und zweistufigen Analyse der RNS II reproduzierbar gefunden wurden. Die nummerierten Striche zeigen die Position von RNA-Fragmenten aus der einstufigen Analyse (Abb. 11A) und die nicht nummerierten Striche die ungefähre Position von RNA-Fragmenten aus der zweistufigen Analyse.



4. Diskussion

4.1. Die Grenzen der "konventionellen Fragmenttechnik" und die Möglichkeiten zur Analyse der Protein-RNA-Vernetzung

Die milde enzymatische Verdauung ribosomaler Untereinheiten von Escherichia coli hat zu einer Anzahl spezifischer Ribonukleoprotein-Fragmente geführt, die Informationen über die räumliche Organisation der Partikel gebracht haben (Schendel et al., 1972, Morgan und Brimacombe, 1973, Roth und Nierhaus, 1973, Newton und Brimacombe, 1974).

Der Versuch, mit Hilfe von Streptomycin-Revertanten von E. coli, die ein verändertes Protein S4 haben (z.B. Deusser et al., 1970), eine vom Wildtyp verschiedene Spaltung der 30S Untereinheiten zu bewirken, scheiterte (3.1.1.). Es wurden in beiden Fällen dieselben RNP-Partikel erhalten. Es muß daher angenommen werden, daß trotz der reduzierten Bindungsspezifität und der unterschiedlichen Länge des mutierten Proteins (Daya-Grosjean et al., 1972, Hasenbank et al., 1973), der Bindungsbereich von S4 an der 16S RNA unverändert ist; d.h. der gleiche RNA-Bereich ist vor Nukleaseangriff geschützt.

Die Entwicklung neuer Spaltungsmethoden für intakte ribosomale Untereinheiten machte die Grenzen dieses Verfahrens deutlich. Es zeigte sich, daß Bedingungen (z.B. niedrige Ionenkonzentrationen), die aufgrund einer gewissen Auffaltung der Partikel zur stärkeren Spaltung führen, gleichzeitig einen Spezifitätsverlust der gewonnenen Fragmente bewirken (3.1.2.). Die Versuche in Gegenwart von 5 mM EDTA zeigen, daß eine Auffaltung der Untereinheiten zu einem totalen Verlust der spezifischen Protein-RNA-Wechselwirkung und zum Proteinaustausch führt (Newton et al., 1975). Da die Sekundärstruktur der RNA in 10 mM EDTA noch intakt ist (z.B. Miall et al., 1969, Eilam et al., 1971), kann angenommen werden, daß die Spezifität der Protein-RNA-Bindung weitgehend von der Tertiärstruktur der RNA abhängig ist.

Diese Annahme wird auch durch die Arbeit von Hochkeppel et al. (1976) unterstützt, die feststellten, daß aufgrund einer

anderen RNA-Extraktionsmethode, nämlich mit Essigsäure und Harnstoff im Gegensatz zu Phenol, auch die spezifische, individuelle Bindung von fünf "Nicht-Bindungsproteinen" an die 16S RNA ermöglicht wird. (Primäre Bindungsproteine sind S4, S7, S8, S15, S17 und S20, Übersichtsartikel von Zimmermann in "Ribosomes", 1974). Die so extrahierte RNA zeigte eine geringere Wanderung in der Gel-Elektrophorese als die Phenol-extrahierte RNA, was auf eine ausgeprägtere Tertiärstruktur schließen läßt.

Die Möglichkeit, trotz der beschriebenen Schwierigkeiten weitere Informationen über die Ribosomen-Topographie mit Hilfe von RNP-Fragmenten zu gewinnen, ergibt sich dadurch, ribosomale Proteine und RNA in intakten Partikeln zu vernetzen. Dieses Verfahren führt jedoch zu einer etwas anderen Art von Ergebnissen, da die Vernetzung mit der RNA sowohl an Protein-Bindungsstellen als auch zwischen Proteinen und benachbarten RNA-Regionen stattfinden kann, ohne daß die Proteine an diese RNA-Regionen gebunden sind. Die angewandten Methoden zur Vernetzung zwischen Proteinen und der RNA zeigen einige Unterschiede.

Die Bestrahlung der 30S Untereinheiten mit geringen Dosen UV-Licht führte zur kovalenten Vernetzung von Protein S7 mit der 16S RNA (Möller und Brimacombe, 1975). Mit Hilfe dieser Methode konnte der Kontaktbereich dieses Proteins an der RNA genauer bestimmt werden (vgl. 3.4. und nächstes Kapitel). Die Vernetzung zwischen Protein S7 und der RNA ist irreversibel, was sich daran zeigt, daß selbst nach starker Nuklease-Behandlung einige gebundene Nukleotide am Protein S7 nachgewiesen werden konnten. Diese ungefähr 5-7 Nukleotide bewirkten eine Beweglichkeitsänderung des Proteins in der Gel-Elektrophorese (vgl. Abb. 7 und Möller und Brimacombe, 1975).

Die irreversible Protein-RNA-Vernetzung eröffnet außerdem die Möglichkeit (wie im Fall des UV-bestrahlten tRNA~Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Komplexes (Schoemaker und Schimmel, 1974)) den bzw. die Vernetzungsstellen auf der Ebene von Oligonukleotiden und Oligopeptiden zu analysieren. Eine sol-

Analyse ist für die Zukunft auch deshalb erforderlich, weil viele Proteine eine langgestreckte Form haben (z.B. Tischendorf et al., 1975) und es deshalb besonders wichtig ist zu wissen, welcher Bereich eines Proteins mit einer bestimmten Region der RNA in Kontakt ist.

Im Gegensatz zur Behandlung mit UV-Licht führte die "Formaldehyd-Methode" zur Vernetzung fast aller 30S Proteine mit der 16S RNA (Möller et al., 1976). Diese Reaktion ist jedoch reversibel, und es ist daher nicht möglich, wie oben beschrieben, die an der Vernetzung beteiligten Oligonukleotide und Oligopeptide zu identifizieren. Trotz der Reversibilitätsprobleme und des fehlenden Nachweises einer kovalenten Bindung war es möglich, spezifische mit Formaldehyd vernetzte Protein-RNA-Komplexe zu isolieren (vgl. 3.5. und siehe unten).

Obwohl die angewandten Vernetzungsbedingungen unterschiedliche Eigenschaften zeigten (irreversible Vernetzung eines Proteins nach UV-Bestrahlung und reversible Vernetzung mehrerer Proteine nach Formaldehyd-Behandlung), konnte grundsätzlich das gleiche Verfahren für die Identifizierung der Proteine an bestimmten RNA-Sequenzen angewandt werden. Es besteht somit die Möglichkeit, anhand dieser Methode weitere Proteinvernetzungsgebiete an der RNA mit Hilfe anderer Vernetzungsreagenzien zu bestimmen. Die Kombination von Ergebnissen unterschiedlicher Protein-RNA-Vernetzungsmethoden sollte zu einem besseren Einblick in die ribosomale Topographie führen.

4.2. Eingrenzung des Bindungsbereiches von Protein S7 innerhalb der 30S Untereinheit

Das Protein S7 gehört zu den sogenannten primären Bindungsproteinen und bindet als einziges dieser Proteine innerhalb einer 500 Nukleotid-Sequenz im 3'-Bereich (Sektion O'-A) der 16S RNA (Zimmermann et al., 1975). Aufgrund einer anderen Methode, nämlich der milden enzymatischen Verdauung intakter 30S Untereinheiten, konnte der S7-Bindungsbereich zusammen

mit vier anderen Proteinen (S9, S10, S14, S19) innerhalb einer 430 Nukleotide umfassenden RNA-Sequenz genauer lokalisiert werden (Yuki und Brimacombe, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Kontaktbereich von Protein S7 innerhalb der 430 Nukleotid-Sequenz weiter eingengt. Die beschriebenen Ergebnisse (3.2. - 3.4.) sind in Abb. 16 zusammengefaßt. Der Hauptkontaktbereich von S7 liegt im RNA-Fragment 2 (Sektion P-A der 16S RNS), wie durch die UV-Vernetzungs-Versuche bewiesen wurde. Auch die durch Formaldehyd induzierte Vernetzung von S7 liegt in diesem Bereich der RNA (Sektion K-A; vgl. Abb. 13). Gleichzeitig wurde ein RNP-Fragment mit den Proteinen S7 und S19 isoliert, dessen RNA-Gehalt aus zwei getrennten Nukleotid-Sequenzen besteht, nämlich dem RNA-Fragment 2 (Sektion P-A) und dem RNA-Fragment 3 (Sektion O'-E'; siehe Abb. 16). Aus diesem Ergebnis kann nicht geschlossen werden, daß Protein S7 zwei Bindungsbereiche mit der 16S RNA hat. Der Befund, daß die beiden RNA-Fragmente auch in Abwesenheit der Proteine in Kontakt sind (siehe 3.3.) und daß außerdem noch Protein S19 im "Schulterfragment" vorhanden ist, macht es fraglich, ob S7 wirklich auch an RNA-Fragment 3 bindet. Diese Ungewißheit erfordert es, zwischen RNA-Bereichen, die einen direkten Kontakt mit einem Protein zeigen und RNA-Sequenzen, die sich nur aufgrund ihrer Sekundär- oder Tertiärstruktur in der Nähe eines Proteins befinden, zu unterscheiden.

4.3. Vergleich der Vernetzung durch Formaldehyd mit anderen Daten über die ribosomale Struktur

In der vorliegenden Arbeit konnten die durch Formaldehyd induzierten Vernetzungsstellen bei einer Anzahl von Proteinen in zwei großen RNA-Bereichen lokalisiert werden (vgl. Abb. 13). Der eine umfaßt ungefähr 900 Nukleotide und beginnt am 5'-Ende der 16S RNA (Sektion L-O) (siehe 3.6.).

Er enthält die vernetzten Proteine S3, S4, S5, S7, S9(11), S12, S13 und S18. Der zweite RNA-Bereich, der von Yuki

und Brimacombe (1975) untersuchten 430 Nukleotid-Sequenz entspricht, enthält ebenfalls Vernetzungsstellen von S4, S7, S9(11) und S13, zusammen mit S14. Der Befund, daß Protein S21 zwar innerhalb der gesamten 30S Untereinheit vernetzt ist (RNP-Fragment I, Abb. 13), jedoch nicht in den RNP-Fragmenten II und III auftaucht, deutet darauf hin, daß die Vernetzungsstelle von S21 innerhalb der letzten 150 Nukleotide am 3'-Ende der 16S RNA liegt. Dieser Schluß stimmt mit dem Befund von Czernilofsky et al. (1975) überein, wonach das 3'-Ende der 16S RNA nach Perjodat-Oxydation mit S21 vernetzt werden konnte.

Die Lokalisierung der Proteine S5, S14 und S18 in vernetzten RNP-Fragmenten steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Morgan und Brimacombe (1973) sowie von Yuki und Brimacombe (1975). Protein S7, das "normalerweise" innerhalb des RNP-Fragments III bindet, zeigt eine weitere schwache Vernetzungsstelle im RNP-Fragment II. Da S7 jedoch zu den langgestreckten Proteinen gehört (Tischendorf et al., 1975), ist es wahrscheinlich, daß dieses Protein innerhalb des intakten Partikels mehrere Kontaktpunkte mit der RNA hat. Das gleiche gilt für Protein S4.

Experimente mit isolierten S4-16S RNA-Komplexen haben gezeigt, daß der Bindungsbereich von S4 innerhalb der 900 Nukleotide vom 5'-Ende der 16S RNA liegt (z.B. Zimmermann et al., 1972). Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse wiesen neben der Vernetzung von Protein S4 in dem 5'-Bereich der RNA noch eine zweite, sogar stärkere Vernetzung innerhalb des RNP-Fragments III nach. Da sich dieser Befund von den erwähnten Ergebnissen mit isolierten S4-16S RNA-Komplexen unterscheidet, besteht die Möglichkeit, daß eine etwas andere Protein-RNA-Wechselwirkung in den intakten Partikeln als in isolierten Komplexen vorliegen.

Es ist jedoch wahrscheinlicher, daß die verschieden starke Vernetzung des Proteins S4 durch eine unterschiedliche Verteilung des Reagenzes an den RNA-Kontaktbereichen im Partikel bewirkt wurde. Aufgrund der Hypothese, daß bei der in vivo-Entstehung der 30S Untereinheit die Bindung von Protein S4

zuerst im 5'-Bereich der 16S RNA erfolgt, und erst nach weiterer Synthese der 16S RNA (Syntheserichtung vom 5'-Ende zum 3'-Ende) ein Kontakt mit dem 3'-Bereich zustande kommt, ist es wahrscheinlich, daß der zweite Kontaktbereich des Proteins in der äußeren Region des Partikels liegt und somit für das Reagenz leichter erreichbar ist. In diesem Zusammenhang ist es außerdem bemerkenswert, daß die primären Bindungsproteine zu den mit Formaldehyd relativ schwach vernetzten Proteinen gehören (siehe Tabelle 2). Dieser Befund führt zu zwei möglichen Erklärungen. Die primären Bindungsproteine könnten entweder wegen ihrer Lage im Inneren des Partikels oder wegen eines starken Kontaktes mit der RNA nicht so leicht für das Reagenz zugänglich sein.

Die Vernetzung von Protein S13 mit beiden RNA-Sequenzbereichen weist auch für dieses Protein auf einen multiplen Bindungsbereich hin. Dies Resultat wird dadurch unterstützt, daß einerseits Yuki und Brimacombe (1975) Protein S13 innerhalb des RNP-Fragmentes III nachwiesen und andererseits Muto et al. (1974) die Bindungsstelle von isoliertem S13 innerhalb der 900 Nukleotide vom 5'-Ende der 16S RNA identifizierten. Roth und Nierhaus (1973) fanden Protein S13 ebenfalls in beiden RNP-Fragmenten.

Protein S9 bindet "normalerweise" in RNP-Fragment III (Yuki und Brimacombe, 1975). Da S9 in der Proteinanalyse nicht von S11 eindeutig getrennt werden kann, besteht die Möglichkeit, daß die Vernetzung in RNP-Fragment III durch Protein S9 und die in RNP-Fragment II durch S11 hervorgerufen wird. Auch der umgekehrte Fall sowie eine Kombination beider Möglichkeiten können nicht ausgeschlossen werden.

Die Proteine S3 und S12, die im RNP-Fragment II gefunden wurden, sind bisher noch nicht in RNA-Fragmenten lokalisiert worden.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen außerdem eine interessante Übereinstimmung mit dem 30S Modell, das aufgrund von immuno-elektroskopischen Daten aufgestellt wurde (Tischendorf et al., 1975).

Es ist auffallend, daß von den Proteinen S4, S7, S9(11), S13

und S14, die mit der RNA-Region K-A vernetzt sind (siehe Abb. 16) jedes mindestens eine Antikörper-Determinante im "Kopf" des Partikels hat. Diese Region ist in Abb. 17 durch Schraffierung markiert. Protein S21, das, wie schon erwähnt, mit dem 3'-Ende der 16S RNA vernetzt werden kann (Czernilofsky et al., 1975), hat ebenfalls eine Antikörper-Bindungsstelle in diesem Bereich. Die Daten weisen darauf hin, daß sich das 3'-Ende der 16S RNA (Sektion K-A) innerhalb der markierten Region des Kopfes befindet.

Über die Lage der vernetzten Proteine in RNP-Fragment II kann wenig gesagt werden, da die Antikörper-Bindungsstellen von S3 und S5 über den gesamten Rücken der 3oS Untereinheit verteilt sind.

4.4. Untersuchungen der Tertiärwechselwirkungen innerhalb der 16S RNA

In die vorliegende Arbeit wurde erstmals eine Tertiärwechselwirkung zwischen entfernt liegenden RNA-Sequenzen (Sektion O'-E' und P-A) im 3'-Bereich der 16S RNA gefunden, die nach mildem enzymatischem Abbau intakter 3oS Untereinheiten isoliert worden waren (siehe 3.3. und vgl. 4.2.).

Die Untersuchung von isolierten Protein-RNA-Komplexen zeigte eine ähnliche Wechselwirkung zwischen zwei, durch ungefähr 120 Nukleotide getrennten RNA-Sequenzen (Sektion H"-Q und M-C") im 5'-Bereich der 16S RNA (z.B. Ungewickell et al., 1975). Diese Wechselwirkung wurde jedoch innerhalb der RNA II, die aus intakten 3oS Untereinheiten isoliert wurde, bis jetzt nicht gefunden (3.6.). Alle identifizierten großen RNA-Fragmente (1-4) enthalten die in Abb. 16 eingezeichnete nicht-unterbrochene Sequenz. Es ist deshalb nicht klar, ob diese Tertiärwechselwirkung auch in intakten Partikeln vorhanden ist.

Es ist möglich, daß die angewandten Methoden (2.9. und Ungewickell et al., 1975) nur zur Identifizierung starker Wechselwirkungen ausreichen. Die Verfahren sind außerdem von der Anzahl der Angriffspunkte der jeweiligen Nuklease abhängig.

Aus diesen Gründen ist es notwendig, in Zukunft Methoden zur RNA-RNA-Quervernetzung auszuarbeiten, um solche Wechselwirkungen innerhalb intakter Untereinheiten eindeutiger nachweisen zu können.

Die Notwendigkeit, RNA-RNA-Wechselwirkungen zu untersuchen, begründet sich dadurch, daß das Bakterien-Ribosom zu zwei Dritteln aus RNA besteht. Es ist daher anzunehmen, daß mehrere solcher Wechselwirkungen innerhalb der Untereinheiten vorliegen und daß diese wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der ribosomalen Konformation spielen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mit verschiedenen Methoden Ribonukleoprotein-Fragmente aus intakten 30S Untereinheiten von Escherichia coli Wildtyp und von Streptomycin-Revertanten isoliert.

Die Streptomycin-Revertanten haben gegenüber dem E. coli Wildtyp ein verändertes Protein S4. Die 30S Untereinheiten der Revertanten wurden unter milden Bedingungen mit RNase T₁ gespalten. Trotz der relativ starken Veränderung im Protein ergaben die angewandten Spaltungsbedingungen keine Unterschiede zwischen den RNP-Fragmenten, die aus den S4-Mutanten und dem Wildtyp isoliert wurden.

Es wurde gezeigt, daß Spaltungsbedingungen, die zur Isolierung kleinerer RNP-Fragmente führen, gleichzeitig einen Verlust der spezifischen Protein-RNA-Wechselwirkung bewirken.

Es war möglich, mit Hilfe der enzymatischen Spaltung radioaktiv markierter 30S Untereinheiten in Gegenwart von Natriumdesoxycholat ein kleines RNP-Fragment mit den Proteinen S7 und S19 sowie geringen Mengen von S13 oder S14 zu isolieren. Die Oligonukleotid-Analyse des Fragments ergab, daß die RNA aus zwei getrennten Nukleotid-Sequenzen (Sektion O'-E' und P-A) der 16S RNA besteht. Die zwischen den beiden RNA-Sequenzen liegende Sektion K fehlte.

Es wurde nachgewiesen, daß zwischen diesen RNA-Sequenzen (Sektion O'-E' und P-A) auch in Abwesenheit der Proteine eine Wechselwirkung besteht. Dieser Befund läßt Rückschlüsse über die Tertiärstruktur der ribosomalen RNA innerhalb der kleinen Untereinheit zu.

Die Bestrahlung von 30S Untereinheiten von E. coli mit UV-Licht unter milden Bedingungen führt zur irreversiblen Vernetzung von Protein S7 mit der 16S RNA. Es wurden mit UV-Licht bestrahlte radioaktiv markierte 30S Untereinheiten mit RNase T₁ gespalten. Nach Entfernung der ungebundenen Proteine auf SDS-Gelen wurde der vernetzte Protein S7-RNA-Komplex untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der Vernetzungsbereich von S7 innerhalb des 3'-Bereiches der 16S RNA liegt und zwar wahrscheinlich innerhalb einer Sequenz (Sektion P-A), die 240 Nukleo-

tide umfaßt.

Die Behandlung der 30S Untereinheiten von E. coli mit geringen Mengen Formaldehyd (0,03 %) führt zu einer reversiblen Vernetzung von fast allen Proteinen mit der 16S RNA. Die mit Formaldehyd behandelten radioaktiv markierten 30S Untereinheiten wurden mit RNase T₁ gespalten, und nach der Entfernung der ungebundenen Proteine (siehe oben) wurden die Kontaktbereiche der vernetzten Proteine mit der RNA untersucht. Es zeigte sich, daß die vernetzten Proteine weitgehend in zwei RNA-Regionen lokalisiert sind. Innerhalb der 900 Nukleotide, die am 5'-Ende der 16S RNA liegen, wurden Vernetzungsstellen der Proteine S3, S5, S9(11) und S13 gefunden; die Proteine S4, S7, S12 und S18 zeigten eine etwas schwächere Vernetzung in diesem RNA-Bereich. An einer 430 Nukleotide umfassenden RNA-Sequenz im 3'-Bereich der 16S RNA (Sektion O'-A) waren die Proteine S4, S7, S9(11), S13 und S14 vernetzt. Vernetztes Protein S21 wurde nur in der ungespaltenen 30S Untereinheit und nicht in den Fragmenten gefunden. Die genauere Lokalisierung der Vernetzungsstellen im 3'-Bereich der RNA zeigte, daß die fünf Proteine (S4, S7, S9(11), S13 und S14) in Kontakt mit den RNA-Regionen K-P-P'-E-A stehen.

Um auch innerhalb der 900 Nukleotide enthaltenden Sequenz am 5'-Ende der 16S RNA die Protein-Vernetzungsstellen näher zu bestimmen, wurde der RNA-Gehalt von vernetzten Protein-RNA-Komplexen in der Oligonukleotid-Analyse untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß Vernetzungsstellen von Protein S3 und S5 innerhalb einer 500 Nukleotide umfassenden Sequenz liegen (Sektion L-I").

Im Diskussionsteil dieser Arbeit werden die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen angewendeten Methoden besprochen, und es wird versucht, aus der Kombination der eigenen mit anderen Ergebnissen ein möglichst detailliertes Bild von der Lage der RNA und der in ihrer Nähe befindlichen Proteine in der 30S Untereinheit von E. coli Ribosomen zu gewinnen.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
A ₂₆₀	= Absorption bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer in 1 cm hohen Küvetten
APS	= Ammoniumperoxodisulfat
BPB	= Bromphenolblau
DNase	= Deoxyribonuclease I
DOC	= Natriumdesoxycholat
EDTA	= Äthylendinitrilotetraessigsäure: Dinatriumsalz
g	= Gravitationsbeschleunigung (981 Meter/sec ²)
PPO	= 2,5 Diphenyloxazole (Packard)
IpM	= Impulse pro Minute
mCi	= mCurie
RNA	= Ribonukleinsäure
RNP	= Ribonukleoprotein
RNase A, T ₁	= Ribonuklease A, T ₁
S	= Svedbergkonstante sec ⁻¹³
Sarkosyl	= N-Lauroyl-Sarcosin
SDS	= Sodium-Dodecyl-Sulphate (Natriumdodecylsulfat)
Soluene	= Soluene-350 (Packard)
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	= Tris-hydroxymethyl-amino-methan
Urea	= Harnstoff
UpM	= Umdrehungen pro Minute
1-D	= ein-dimensionale Acrylamid-Gelelektrophorese
2-D	= zwei-dimensionale Acrylamid-Gelelektrophorese

7. Literaturverzeichnis

Amons, R., Möller, W.

On the mode of reaction of formaldehyd with ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 272 (1972) 95-107

Anker, H.S.

A solubilizable scrylamide gel for electrophoresis
FEBS Letters 7, 293 (1970)

Apirion, D.

Altered ribosomes in a suppressor strain of Escherichia coli
J. Mol. Biol. 16 (1966) 285-301

Birge, E.A., Kurland, C.G.

Reversion of a Streptomycin-dependent strain of Escherichia coli
Molec. Gen. Genet. 109 (1970) 356-369

Brimacombe, R., Morgan, J.M., Cox, R.A.

An Improved Technique for the Analysis of Ribonucleo-
protein Fragments from Escherichia coli 30S Ribosomes
Eur. J. Biochem. 23 (1971) 52-60

Brownlee, G.G.

Determination of Sequences in RNA
(Work, E., Work, T.S. eds.) North Holland Publishing Co.,
Amsterdam (1972)

Czernilofzky, A.P., Kurland, C.G., Stöffler, G.

30S Ribosomal Proteins Associated with the 3'Terminus
of 16S-RNA
FEBS Letters 58 (1975) 281-284

Dahlberg, A.E., Dingmann, C.W., Peacock, A.C.

Electrophoretic Characterisation of Bacterial Poly-
ribosomes in Agarose-Acrylamide Composite Gels
J. Mol. Biol. 41 (1969) 139-147

Daya-Grosjean, L., Garrett, R.A., Pongs, O., Stöffler, G., Wittmann, H.-G.

Properties of the Interaction of Ribosomal Protein S4 and 16S-RNA in Escherichia coli. Revertants from Streptomycin Dependence to Independence

Molec. Gen. Genet. 119 (1972) 277-286

Deusser, E., Stöffler, G., Wittmann, H.-G.

Ribosomal Proteins XVI. Altered S4 proteins in E. coli revertants from Streptomycin dependence to independence

Molec. Gen. Genet. 109 (1970) 298-302

Ehresmann, G., Stiegler, P., Mackie, G.A., Zimmermann, R.A., Ebel, J.P., Fellner, P.

Primary sequence of the 16S-RNA of Escherichia coli

Nucleic Acids Research 2 (1975) 265-278

Eilam, Y., Elson, D.

Unfolding of the 30S Ribosomal Subunit of Escherichia coli and the Conformation of the Unfolded Subunit. Parallel Sedimentation and Optical Rotatory Dispersion Studies

Biochemistry 10 (1971) 1489-1493

Feldman, M.Y.

Reactions of Nucleic Acids and Nucleoproteins with Formaldehyde

Progr. Nucleic Acids Res. 13 (1973) 1-49

Fellner, P., Ehresmann, C., Ebel, J.P.

The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli

Biochimie 54 (1972) 853-900

Garrett, R.A., Rak, K.H., Daya, L., Stöffler, G.

Ribosomal Proteins XXIX. Specific Protein Binding Sites on 16S rRNA of Escherichia coli

Molec. Gen. Genet. 114 (1971) 112-124

Gesteland, R.F.

Unfolding of Escherichia coli Ribosomes by Removal of Magnesium

J. Mol. Biol. 18 (1966) 356-371

Gorelic, L.

Photoinduced covalent crosslinkage, in situ, of Escherichia coli 5oS ribosomal proteins to rRNA
Biochim. Biophys. Acta 390 (1975) 209-225

Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G.

The Ribosomal Proteins of Escherichia coli
I. Purification of the 3oS Ribosomal Proteins
Biochemistry 8 (1969) 2897-2905

Hasenbank, R., Guthrie, C., Stöffler, G., Wittmann, H.-G.,
Rosen, L., Apririon, D.

Elektrophoretic and Immunological Studies on Ribosomal
Proteins of 100 Escherichia coli Revertants from Streptomycin Dependence
Molec. Gen. Genet. 127 (1973) 1-18

Held, W.A., Ballon, B., Mizushima, S., Nomura, M.

Assembly Mapping of 3oS Ribosomal Proteins from Escherichia coli
J. Biol. chem. 249 (1974) 3103-3111

Hochkeppel, H.-K., Spicer, E., Craven, G.R.

A Method of Preparing Escherichia coli 16S RNA Possessing
Previously Unobserved 3oS Ribosomal Protein Binding Sites
J. Mol. Biol. 101 (1976) 155-170

Kaltschmidt, E., Wittmann, H.-G.

Ribosomal Proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide
gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins
Anal. Biochem. 36 (1970) 401-412

Lake, J.A.

Ribosome Structure Determined by Elektron Microscopy of
Escherichia coli Small Subunits, Large Subunits and
Monomeric Ribosomes
J. Mol. Biol. 105 (1976) 131-159

Lutter, L.C., Zeichardt, H., Kurland, C.G.

Ribosomal Protein Neighborhoods I. S18 and S21 as well
as S5 and S8 are Neighbors
Molec. Gen. Genet. 119 (1972) 357-366

Mackie, G.A., Zimmermann, R.A.

Characterisation of Fragments of 16S Ribonucleic Acid
Protected against Pancreatic Ribonuclease Digestion by
Ribosomal Protein S4

J. Biol. Chem. 250 (1975) 4100-4112

Markovitz, A.

Ultraviolet Light-Induced stable complexes of DNA and
DNA-Polymerase

Biochim. Biophys. Acta 281 (1972) 522-534

Michalski, C.J., Sells, B.H.

Molecular Morphology of Ribosomes: Iodination of
Escherichia coli . Ribosomal Proteins with Solid-State
Lactoperoxidase

Eur. J. Biochem. 52 (1975) 385-389

Miall, S.-H., Walker, I.O.

Structural Studies on Ribosomes: II. Denaturation and
Sedimentation of Ribosomal Subunits unfolded in EDTA

Biochim. Biophys. Acta 174 (1969) 551-560

Möller, K., Brimacombe, R.

Specific cross-linking of Proteins S7 and L4 to Ribosomal
RNA by UV Irradiation of Escherichia coli Ribosomal
Subunits

Molec. Gen. Genet. 141 (1975) 343-335

Möller, K., Ross, A., Buddle, G., Brimacombe, R.

The Use of Formaldehyde in RNA-Protein Crosslinking
Studies with Ribosomal Subunits from Escherichia coli

1976 an Eur. J. Biochem. geschickt

Morgan, J.

Microfilaments from Amoeba Proteins

Exp. Cell Res. 65 (1971) 7-16

Morgen, J., Brimacombe, R.

A Series of Specific Ribonucleoprotein Fragments from
the 30S-Subparticle of Escherichia coli Ribosomes

Eur. J. Biochem. 29 (1972) 542-552

Morgan, J., Brimacombe, R.

A Preliminary Three-Dimensional Arrangement of the Proteins in the Escherichia coli 30S-Ribosomal Sub-Particle
Eur. J. Biochem. 37 (1973) 472-480

Muto, A., Ehresmann, C., Fellner, P., Zimmermann, R.A.

RNA-Protein Interactions in the Ribosome
I. Characterization and Ribonuclease Digestion of 16S
RNA-Ribosomal Protein Complexes
J. Mol. Biol. 86 (1974) 411-432

Newton, I., Brimacombe, R.

Two Specific Ribonucleoprotein Fragments from the 50S-Sub-Particle of Escherichia coli Ribosomes
Eur. J. Biochem. 48 (1974) 513-518

Newton, I., Rinke, J., Brimacombe, R.

Random Exchange of Ribosomal Proteins in EDTA Sub-Particles
FEBS Letters 51 (1975) 215-218

Nomura, Tissières, Lengyel

"Ribosomes", Monograph. Series
Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1974)

Ron, E.Z., Kohler, R.E., Davies, B.D.

Polysomes Extracted from Escherichia coli by Freeze-Thaw-Lysozyme Lysis
Science (Wash. D.C.) 153 (1966) 1119-1120

Roth, R.E., Nierhaus, K.H.

Isolation of Four Ribonucleoprotein Fragments from the 30S Subunit of E. coli Ribosomes
FEBS Letters 31 (1973) 35-38

Roth, H.E., Nierhaus, K.H.

Structural and functional studies of ribonucleoprotein fragments isolated from Escherichia coli 50S subunits
J. Mol. Biol. 94 (1975) 111-121

Sanger, F., Brownlee, G.G., Barrell, B.G.

A Two-dimensional Fractionation Procedure for Radioactive Nucleotides
J. Mol. Biol. 13 (1965) 373-398

Schendel, P., Maeba, P., Craven, G.R.

Identification of the Proteins Associated with Subparticles
Produced by Mild Ribonuclease Digestion of 30S Ribosomal
Particles from Escherichia coli
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 544-548

Schoemaker, H.J.P., Schimmel, P.R.

Photo-induced Joining of a Transfer RNA with its Cognate
Aminoacyl-transfer RNA Synthetase
J. Mol. Biol. 84 (1974) 503-513

Sommer, A., Traut, R.

Identification by Diagonal Gel Electrophoresis of Nine
Neighboring Protein Pairs in the Escherichia coli 30S
Ribosome Crosslinked with Methyl-4-Mercaptobutyrimidate
J. Mol. Biol. 97 (1975) 471-481

Spirin, A.S.

Structural Transformations of Ribosomes
(Dissociation, Unfolding and Disassembly)
FEBS Letters 40 (1974) 38-47

Stott, D.J., Munro, A.J.

The formation of pyrrolid-2-one-5-carboxylic acid at the
N-terminus of immunoglobulin G heavy chain
Biochem. J. 128 (1972) 1221-1227

Tischendorf, G.W., Zeichardt, H., Stöffler, G.

Architecture of the Escherichia coli ribosome as deter-
mined by immune electron microscopy
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 4820-4824

Traub, P., Nomura, M.

Structure and Function of Escherichia coli Ribosomes
I. Partial Fractionation of the Functionally Active Ri-
bosomal Proteins and Reconstitution of Artificial Sub-
ribosomal Particles
J. Mol. Biol. 34 (1968) 575-593

Uchida, T., Bonen, L., Schaup, H.W., Lewis, B.J., Zablen, L.,
Woese, C.

The Use of Ribonuclease U_2 in RNA Sequence Determination
J. Mol. Evolut. 3 (1974) 63-77

- Ungewickell, E., Ehresmann, C., Stiegler, P., Garrett, R.
Evidence for tertiary structural RNA-RNA interactions
within the protein S4 binding site at the 5'-end of 16S
ribosomal RNA of Escherichia coli
Nucleic Acids Research 2 (1975) 1867-1888
- Vigne, R., Jordan, B.R.
Conformational analysis of RNA molecules by partial
RNAse digestion and two dimensional acrylamide gel
electrophoresis. Application to E. coli 5S RNA
Biochimie 53 (1971) 981-986
- Wittmann, H.-G., Stöffler, G., Hindenach, J., Kurland, C.G.,
Randall-Hazelbauer, L., Birge, E.A., Nomura, M., Kaltschmidt,
E., Mizushima, S., Traut, R.R., Bickie, T.A.
Correlation of 30S Ribosomal Proteins of Escherichia coli
Isolated in Different Laboratories
Mol. Gen. Genet. 111 (1971) 327-333
- Yuki, A.
Tentative Identification of a "Maturation Enzyme" for
Precursor 16S ribosomal RNA in Escherichia coli
J. Mol. Biol. 62 (1971) 321-329
- Yuki, A., Brimacombe, R.
Nucleotide Sequences of Escherichia coli 16S-RNA Associated
with Ribosomal Proteins S7, S9, S10, S14, and S19
Eur. J. Biochem. 56 (1975) 23-34
- Zimmermann, R.A., Muto, A., Fellner, P., Ehresmann, C.,
Bralant, C.
Location of Ribosomal Protein Binding Sites on 16S Ribo-
somal RNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 1282-1286
- Zimmermann, R.A., Mackie, G.A., Muto, A., Garrett, R.A.,
Ungewickell, E., Ehresmann, C., Stiegler, P., Ebel, J.-P.,
Fellner, P.
Location and Characteristics of ribosomal protein binding
sites in the 16S RNA of Escherichia coli
Nucleic Acids Research 2 (1975) 279-302

Danksagung

Herrn Dr. R. Brimacombe möchte ich herzlich danken für seine stete Bereitschaft, diese Arbeit mit Ratschlägen und Ermutigungen zu fördern.

Herrn Professor Dr. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung der Arbeit, sowie für die zur Verfügung gestellten Streptomycin Revertanten.

Herrn Dr. A. Yuki danke ich für die Einweisung in die Methode der Oligonukleotid-Analyse und für seine Unterstützung bei der Anwendung.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

- 29.10.1948 geboren in Celle, Niedersachsen
- 1955 - 59 Besuch der Volksschule in Celle
- 1959 - 67 Besuch des Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasiums in Celle, abgeschlossen mit dem Zeugnis der Hochschulreife
- 1967 - 69 Apotheken-Praktikum in der Apotheke am Amtshof in Winsen/Aller, abgeschlossen mit der Pharmazeutischen Vorprüfung in Lüneburg
- 1969 - 72 Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
- 4.10.1972 Pharmazeutisches Staatsexamen abgelegt
- 1973/74 Beschäftigung in einer öffentlichen Apotheke in Berlin-Charlottenburg als approbierte Apothekerin
1. 4.1974 Beginn der Doktorarbeit im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem, Abteilung Professor Dr. Wittmann unter Leitung von Dr. R. Brimacombe

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30